

Überwindung der P-Glykoprotein (MDR1)-abhängigen Multidrugresistenz mittels RNA-Interferenz

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

***Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin***

von

Diplom-Biologin Alexandra Eva Stege
geboren am 29.07.1975 in Fulda

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. PD Dr. Wolfgang Dreier

2. PD Dr. Hermann Lage

3. PD Dr. Carsten Denkert

eingereicht: 02. August 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Dezember 2006

Zusammenfassung

P-Glykoprotein als Produkt des *MDR1*-Gens stellt einen gut untersuchten Mediator der Multidrugresistenz (MDR) in humanen Malignomen dar. Die Überexpression dieses ABC-Transporters steht in Korrelation zu einer erniedrigten Tumorremission und einer kürzeren Überlebensrate der Patienten. Bisherige Versuche, das Protein über niedermolekulare Substanzen (MDR-Modulatoren) zu inhibieren, vermochten in allen bisherigen klinischen Studien nicht zu überzeugen, so daß diese bis heute keinen Eingang in Standardtherapieschemata gefunden haben.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels RNA-Interferenz Strategien die Expression von MDR1 zu hemmen und eine Reversion der zellulären Chemoresistenz sowohl im Zellkultur- als auch im Tiermodell zu erreichen.

Für die *in vitro* Untersuchungen an drei humanen multidrug-resistenten Karzinomzelllinien wurden verschiedene siRNA (*short interfering*) Duplexe und shRNA (*short hairpin*)-exprimierende Vektoren gegen die MDR1 mRNA entwickelt. Die Behandlung der Zellen mit siRNAs führte zu einer bis zu 91 %igen Inhibition der MDR1 mRNA-Expression und zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem Anthrazyklin um 89 %. Diese Effekte konnten über einen Zeitraum von drei bis fünf Tagen aufrechterhalten werden. Die stabile Expression von anti-MDR1 shRNAs führte in zwei der untersuchten Zellmodellen zu einer dauerhaften und kompletten Überwindung des MDR1-abhängigen Resistenzphänotyps.

Im Mausmodell konnte durch intratumorale Applikation des anti-MDR1 shRNA-kodierenden Vektors mittels *low-volume* Jet-Injektion eine komplette Reversion der MDR1-Überexpression sowie eine Wiederherstellung der Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin in dem resistenten Tumormodell erreicht werden. Die Effizienz der kombinierten Gen- und Chemotherapie wird durch die Verminderung des *in vivo* Tumorwachstums auf das Volumen des von der sensiblen Zelllinien-abgeleiteten Tumors reflektiert.

Die Daten verdeutlichen das große Potential, welches die RNA-Interferenz Technik für die Modulation des MDR-Phänotyps in der biomedizinischen Forschung und der gentherapeutischen Anwendung hat.

Abstract

Multidrug resistance (MDR) is the major cause of failure of effective chemotherapeutic treatment of disseminated neoplasms. The "classical" MDR phenotype of human malignancies is mediated by drug extrusion by the adenosine triphosphate binding cassette (ABC)-transporter P-glycoprotein (MDR1/P-gp). For stable reversal of "classical" MDR in three human cancer cell lines by RNA interference (RNAi) technology, two small interfering RNA (siRNA) constructs and four H1-RNA gene promoter-driven expression vectors encoding anti-MDR1/P-gp short hairpin RNA (shRNA) molecules were constructed.

In all cellular systems, siRNAs could specifically inhibit MDR1 expression up to 91% at the mRNA and protein levels. Resistance against daunorubicin was decreased to a maximum of 89%. The introduction of anti-MDR1/P-gp shRNA expression vectors leads in two of the three human cancer cell lines to a complete reversion of the MDR phenotype. The reversal of MDR was accompanied by a complete suppression of MDR1/P-gp expression on mRNA and protein level, and by a considerable increased intracellular anthracycline accumulation in the anti-MDR1/P-gp shRNA-treated cells.

In a mouse xenograft model a complete in vivo restoration of MDR1 overexpression and chemosensitivity to doxorubicin could be obtained by intratumorally jet-injected anti-MDR1 shRNA in a multidrug resistant human cancer tumor model.

The data indicate that the RNA interference technology is tremendously effective in reversing MDR1/P-gp-mediated MDR and is therefore a promising strategy for overcoming MDR by gene therapeutic applications.

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:

**Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen.**

Albert Einstein

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Glossar</i>	<i>VI</i>
1 Einleitung	1
1.1 Chemotherapie	2
1.1.1 Daunorubicin und Doxorubicin.....	2
1.2 Zytostatikaresistenz von Tumorzellen	4
1.3 ABC-Transporter	5
1.4 P-Glykoprotein (ABCB1, MDR1)	7
1.4.1 Lokalisation und Funktion	8
1.4.2 Überwindung der P-Glykoprotein-abhängigen Multidrugresistenz	10
1.5 RNA-Interferenz	11
1.5.1 Genereller Mechanismus (Mammalia).....	12
1.5.2 Bedeutung der RNA-Interferenz für die Forschung.....	13
1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit	15
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Biologisches Material.....	17
2.1.2 Chemikalien und Fertiglösungen.....	18
2.1.3 Enzyme.....	21
2.1.4 Kits	21
2.1.5 Geräte.....	22
2.1.6 Nukleinsäuren	23
2.1.7 Radionukleotide	26
2.1.8 Software	26
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Sterilisierung von Geräten und Lösungen	27
2.2.2 Methoden der eukaryotischen Zellkultur.....	27
2.2.3 <i>in vivo</i> Experimente.....	30
2.2.4 Mikrobiologische Methoden	32

2.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.6	RNA-Techniken	40
2.2.7	Proteintechniken.....	44
3	<i>Ergebnisse</i>	49
3.1	Posttranskriptionelle Genregulation durch exogene siRNAs	49
3.1.1	Auswahl der Zielsequenzen	49
3.1.2	siRNA-abhängige Inhibition der MDR1 mRNA-Expression und Proteinsynthese.....	50
3.1.3	Reversion des Resistenzphänotyps durch siRNAs	59
3.2	Posttranskriptionelle Genregulation durch anti-MDR1 shRNA-kodierende Vektoren in stabilen Transfektanten	64
3.2.1	Konstruktion eines Vektors zur endogenen Expression von shRNAs.....	64
3.2.2	MDR1-Expression in den stabilen Transfektanten.....	68
3.2.3	Nachweis der Expressionsvektoren in den Effektransfektanten.....	69
3.2.4	Effekte auf die P-Glykoprotein-Synthese.....	70
3.2.5	Verhalten der Ausgangszelllinie und der Transfektanten bei Zytostatikabehandlung.....	73
3.3	<i>In vivo</i> Applikation des shRNA MDR-C-kodierenden Vektors in MaTu/ADR abgeleiteten Tumoren	77
3.3.1	Quantifizierung der MDR1 mRNA-Expression im Tumorgewebe.....	78
3.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein im Tumor	79
3.3.3	Chemosensitivierung von MaTu/ADR-abgeleiteten Maustumoren nach der Applikation des shRNA MDR-C kodierenden Vektors.....	80
4	<i>Diskussion</i>	82
4.1	Modulation der MDR1 Biosynthese mittels anti-MDR1 siRNAs	83
4.2	Anwendung von shRNA exprimierenden Vektoren <i>in vitro</i>	85
4.2.1	Auswahl des Vektorsystems und der Zielsequenzen.....	85
4.2.2	Generierung stabiler Transfektanten	86
4.2.3	Funktionelle Untersuchungen der Effektransfektanten	87
4.3	Anwendung von shRNA exprimierenden Vektoren <i>in vivo</i>	89
4.4	Schlußbetrachtung	91
5	<i>Literaturverzeichnis</i>	93
	<i>Danksagung</i>	106
	<i>Lebenslauf</i>	107
	<i>Publikationen</i>	108

<i>Selbständigkeitserklärung</i>	110
--	-----

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Strukturformeln von Daunorubicin und Doxorubicin</i>	3
<i>Abbildung 2: Darstellung der zweidimensionalen Struktur (verändert nach Ambudkar et al., 2003) und Funktion von P-Glykoprotein (verändert nach Hoffmeyer et al., 2000)</i>	8
<i>Abbildung 3: Genereller Mechanismus der RNA-Interferenz (verändert nach Schwarz et al., 2003)</i>	13
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Arten, aktive siRNA in die Zelle einzubringen bzw. zu generieren (nach Wacheck und Vornlocher, 2003).</i>	14
<i>Abbildung 5: Vektorkarte von psiRNA-hH1zeo (www.invivogen.com)</i>	33
<i>Abbildung 6: Charakterisierung der siRNA-abhängigen Erniedrigung des MDR1 und P-Glykoprotein Niveaus in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB</i>	51
<i>Abbildung 7: Charakterisierung der siRNA-abhängigen Erniedrigung des MDR1 und P-Glykoprotein Niveaus in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB</i>	53
<i>Abbildung 8: Charakterisierung der siRNA-abhängigen Erniedrigung des MDR1 und P-Glykoprotein Niveaus in der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR.</i>	55
<i>Abbildung 9: Quantifizierung der siRNA-abhängigen MDR1 mRNA-Repression</i>	57
<i>Abbildung 10: Quantifizierung der siRNA-abhängigen MDR1 mRNA-Repression</i>	59
<i>Abbildung 11: Zytotoxizitätsassay mit Daunorubicin in den siRNA transfizierten EPP85-181RDB</i>	60
<i>Abbildung 12: Zytotoxizitätsassay mit Daunorubicin in den siRNA transfizierten EPG85-257RDB</i>	61
<i>Abbildung 13: Zytotoxizitätsassay mit Doxorubicin in den siRNA transfizierten MaTu/ADR</i>	62
<i>Abbildung 14: Darstellung des Vektorsystems</i>	65
<i>Abbildung 15: Sequenz der chemisch synthetisierten shRNA MDR-B DNA-Oligonukleotide</i>	66
<i>Abbildung 16: Vektorkarte und Restriktionsanalyse verschiedener Bakterienklone</i>	67
<i>Abbildung 17: MDR1 mRNA-Expression in den shRNA-Transfektanten.</i>	69
<i>Abbildung 18: Vektor- und Aldolase-spezifische PCR</i>	70
<i>Abbildung 19: Bestimmung des P-Glykoproteingehalts mittels Western Blot</i>	71
<i>Abbildung 20: Immunzytochemischer Nachweis des P-Glykoproteins</i>	72
<i>Abbildung 21: Immunzytochemischer Nachweis des P-Glykoproteins</i>	73
<i>Abbildung 22: Zytotoxizitätsassay mit Daunorubicin</i>	74
<i>Abbildung 23: Zytotoxizitätsassay mit Doxorubicin</i>	75
<i>Abbildung 24: Expression der siRNA in der stabilen shRNA MDR-C Transfektanten der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR</i>	78
<i>Abbildung 25: Quantifizierung der MDR1 mRNA-Expression in Tumorgewebe</i>	79
<i>Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung von P-Glykoprotein mit mAb C219</i>	80
<i>Abbildung 27: Abnahme des Tumorwachstums in der Maus nach kombinierter Applikation des shRNA MDR-C kodierenden Vektors und Doxorubicin im Verlauf von 40 Tagen</i>	81

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: ABC-Transporter assoziiert mit Zytostatikaresistenz (modifiziert nach Gottesman und Pastan, 1993)</i>	7
<i>Tabelle 2: Beispiele für Substanzen, die durch P-Glykoprotein transportiert werden.</i>	9
<i>Tabelle 3: Humane Karzinomzelllinien</i>	17
<i>Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme</i>	18
<i>Tabelle 5: Verwendete Plasmide</i>	18
<i>Tabelle 6: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide</i>	23
<i>Tabelle 7: Sequenzen der für die shRNA Klonierung verwendeten Oligonukleotide</i>	24
<i>Tabelle 8: Sequenzen der verwendeten siRNAs</i>	25
<i>Tabelle 9: Hybridisierungstemperaturen (T_H) der verwendeten Primer</i>	37
<i>Tabelle 10: Auflistung der für den Western Blot eingesetzten Lösungen und die Dauer ihrer Anwendung</i>	47
<i>Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten siRNAs</i>	50
<i>Tabelle 12: Vergleich des Resistenzphänotyps der untersuchten Karzinomzelllinien nach der transienten Transfektion von anti-MDR1 siRNAs</i>	63
<i>Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten shRNAs und ihrer Zielsequenz</i>	66
<i>Tabelle 14: IC_{50}-Werte und Resistenzfaktoren der untersuchten Zelllinien</i>	76

Glossar

A	Ampère
ABC	<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette
ADR	Adriblastin (Doxorubicin)
<i>antisense</i>	Komplementärstrang einer Nukleinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASO	<i>Antisense</i> -Oligonukleotid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCRP	<u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>r</u> esistance <u>p</u> rotein
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
ccc	<i>covalently closed circular</i> ; Plasmid-DNA
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, <i><u>c</u>omplementary <u>d</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
Ci	Curie
CpG	CG reiche Region der DNA
CFTR	<u>c</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane <u>c</u> onductance <u>r</u> egulator
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i><u>d</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
Doxo	Doxorubicin
ds	doppelsträngig, <i><u>d</u>ouble <u>s</u>tranded</i>
DTT	DL-Dithiothreitol (1,4 – Dithiol 2,3 –dihydroxybutan)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
IE	Internationale Einheit

IC ₅₀	halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenös
<i>in vitro</i>	im Modellsystem
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
kb	Kilobasen
M	Molar
m	milli (10 ⁻³)
MDR	pleiotrope Zytostatikaresistenz, <u>M</u> ultidrug <u>r</u> esistenz
MDR1	Multidrug Resistenz Protein 1 (<i>ABCB1</i> , <i>P-Gp</i>); in der Arbeit wird so das Gen und die mRNA bezeichnet
μ	mikro (10 ⁻⁶)
miRNA	<i>micro</i> RNA; kleine einzelsträngige RNA-Moleküle, die eine Haarnadel-Struktur ausbilden
min	Minute
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger-RNA</i>)
MRP1	Vielfachresistenz-assoziiertes Protein 1, <i><u>m</u>ultidrug <u>r</u>esistance associated protein 1</i>
n	nano (10 ⁻⁹)
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
nm	Nanometer
NMRI:nu/nu	athymische Nacktmäuse
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung, <i><u>p</u>hosphate <u>b</u>uffer <u>s</u>aline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i><u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
P-Gp	P (Permeabilitäts) -Glykoprotein (ABCB1, MDR1, P170); in der Arbeit wird so das Protein bezeichnet
PTGS	<i><u>p</u>ost<u>t</u>ranscriptionale gene <u>s</u>ilencing</i>
rasiRNA	<i><u>r</u>ep<u>e</u>at associated <u>s</u>mall <u>i</u>nterfering RNAs</i>
RISC	<i><u>R</u>NA <u>i</u>nduced <u>s</u>ilencing <u>c</u>omplex</i>
RNAi	RNA-Interferenz

RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro minute, <i>rounds per minute</i>
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
shRNA	kleine hybridisierende RNA, <i>small hybrid RNA</i>
siRNA	kleine interferierende RNA, <i>small interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear</i> RNA; 100 bis 300 bp große RNA-Fragmente
SRB	Sulforhodamin B
ss	einzelsträngig, <i>single stranded</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _H	Hybridisierungstemperatur von Primern in der PCR
TMD	Transmembrandomäne
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitammonolaurat
U	Einheit der Enzymaktivität, <i>Unit</i>
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent
Zeo	Zeocin

1 Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen (Neoplasien) unterscheiden sich durch destruktives und invasives Wachstum von normalen Körperzellen. Grundlagen für die Entstehung von neoplastischen Veränderungen ist die Akkumulation somatischer Mutationen zu Beginn und während der Tumorprogression, beispielsweise Chromosomeninstabilitäten, Basenmutationen, Deletionen und Insertionen. Diese können die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge haben. Aber auch epigenetische Veränderungen wie z.B. DNA-Methylierung spielen im Tumorgeschehen eine Rolle. Als Folge dieser genetischen Varianz kommt es zu den folgenden Zellveränderungen:

- fehlendes Ansprechen des Tumors auf wachstumshemmende Signale
- Immortalität
- Aktivierung von mitogenen Signaltransduktionswegen
- fehlende Apoptose
- Invasivität und Metastasenbildung

Im Jahre 2002 sind nach einer Entwicklungsstudie des Robert Koch-Instituts mehr als 200 000 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland den Folgen einer Tumorerkrankung erlegen (Robert Koch Institut, 2006). Damit stellen maligne Neoplasien die zweithäufigste Todesursache dar, die Tendenz ist weiter steigend. Die hohe Inzidenz und Mortalität maligner Erkrankungen lassen den hohen Stellenwert, der der **Prävention**, der **Diagnose** und der **Therapie** zukommt, erkennen. Ziel der biomedizinischen Forschung ist es, die bestehenden Therapiekonzepte stetig zu verbessern bzw. sie durch neue Ansätze, die vor allem auf molekularbiologischer Ebene angreifen, zu ersetzen.

Die Behandlung von Malignomen erfolgt im Wesentlichen mittels operativer, strahlen- und / oder chemotherapeutischer Verfahren. Zur Effektivitätssteigerung der Behandlung wird in einem multimodalen Therapieschema vornehmlich eine Kombination der verschiedenen Verfahren eingesetzt (Dold *et al.*, 1993). Im folgenden Abschnitt soll das Hauptaugenmerk auf die medikamentöse Behandlung mit antineoplastischen Substanzen (Chemotherapie) gerichtet werden (Kap. 1.1).

1.1 Chemotherapie

Eine Chemotherapie ist indiziert, wenn durch chirurgische Resektion der Tumor nicht vollständig erfaßt werden kann bzw. bestrahlende Maßnahmen keine Wirkung mehr zeigen. Auch zur adjuvanten bzw. neoadjuvanten Behandlung von Metastasen und hämatopoetischen Neoplasien stellt der Einsatz von Chemotherapeutika einen unverzichtbaren Bestandteil der Behandlung dar. Als Grundlage für diese Therapieform dient die Annahme, daß der Anteil an sich teilenden Zellen (Wachstumsfraktion) in einem Tumor größer ist als in normalem Gewebe (Pfreundschuh, 1999). Dementsprechend werden in der Chemotherapie Medikamente eingesetzt, die zytostatisch (potentiell reversibel) oder zytotoxisch (irreversibel) auf Zellteilungsvorgänge einwirken. Der Übergang zwischen zytostatischer und zytotoxischer Wirkung ist von der Dosierung abhängig, so daß für diese chemisch heterogene Substanzgruppe im allgemeinen der Begriff Zytostatika verwendet wird. Nach ihrem Wirkmechanismus werden Zytostatika u. a. in Alkylantien, Antimetabolite, Antibiotika, Mitosehemmstoffe, Enzyme und Hormone eingeteilt (Pfreundschuh, 1999; Wagener, 1996). Aus der Vielzahl von Zytostatika sollen im folgenden Abschnitt zwei Vertreter, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, vorgestellt werden.

1.1.1 Daunorubicin und Doxorubicin

Das aus *Streptomyces peucetius* gewonnene Antibiotikum Daunorubicin (Dubost *et al.*, 1963) gehört zu der Substanzklasse der Anthrazykline. Strukturmerkmal ist ein vom polyzyklischen Naphtacen abgeleitetes Ringsystem mit einem an Ring A α -glykosidisch gebundenen Didesoxyaminozucker (Daunosamin). Doxorubicin, das 14-Hydroxy-Analogon von Daunorubicin, wurde 1969 erstmals aus der Mutante *Streptomyces peucetius* var. *caesius* isoliert und wird heute aus Daunorubicin synthetisiert (Arcamone *et al.*, 1969).

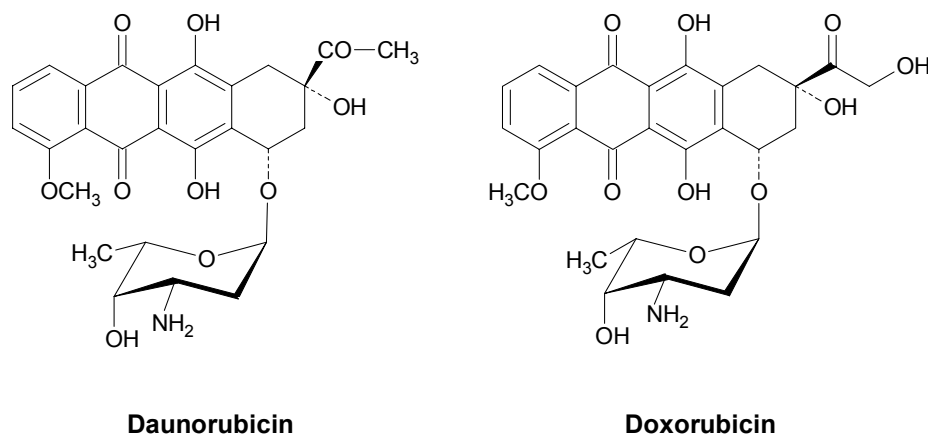


Abbildung 1: Strukturformeln von Daunorubicin und Doxorubicin

Beide Anthrazykline besitzen ein breites antitumorales Spektrum; sowohl epitheliale als auch mesenchymale Tumoren sprechen auf diese Substanzen an. Anwendung finden sie bei der Therapie von Akuter Myeloischer Leukämie (AML), Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) sowie beim Mamma- und Bronchialkarzinom (Booser *et al.*, 1994). Die Wirkung dieser Substanzen ist bei exponentiell wachsenden Zellen am stärksten, wobei Zellen in der S- und der G₂-Phase des Zellzyklus am empfindlichsten reagieren (Pratt *et al.*, 1994). Eine Vielzahl von molekularen Mechanismen sind einzeln oder synergistisch an der therapeutischen und toxischen Wirkung beteiligt. So interkalieren Daunorubicin bzw. Doxorubicin in die Basenpaare des DNA-Doppelstranges und erhöhen dadurch die Stabilität der DNA, was zu einer Hemmung der DNA-Synthese und der DNA-abhängigen RNA-Synthese führt (Aubel-Sadron *et al.*, 1984). Weiterhin werden Helikasen sowie die DNA-Topoisomerase I und II inhibiert. Auch scheint die Bildung von toxischen Intermediaten und die Interaktion mit der Zellmembran eine wichtige Rolle für deren Toxizität zu spielen (Tritton, 1991). Diese Eigenschaften sind auf die Bildung von alkylierenden Substanzen zurückzuführen, die an Proteine, Lipide und DNA binden können. Endergebnis aller zellulären Veränderungen ist die Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose (Ling *et al.*, 1993).

1.2 Zytostatikaresistenz von Tumorzellen

In der klinischen Praxis manifestiert sich das Problem, daß bei einer Vielzahl von Tumorentitäten die eingesetzte Chemotherapie nur unzureichend, vorübergehend oder gar nicht die zu erwartende Wirkung entfaltet. Zurückzuführen ist dies auf eine verminderte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den angewendeten Zytostatika, d.h. die Zellen haben eine Zytostatikaresistenz (Chemotherapie- bzw. Chemoresistenz) ausgebildet. Dabei wird unterschieden zwischen einer primären oder intrinsischen Resistenz, die *per se* besteht und der sekundären oder erworbenen Resistenz, die durch die Chemotherapie induziert wurde (Pastan *et al.*, 1987).

In der klinischen Praxis kann man beobachten, daß rund die Hälfte aller Malignome nicht auf eine Chemotherapie anspricht. Ein gutes Drittel der anfänglich zytostatika-sensitiven Tumoren entwickelt im Laufe der Behandlung eine sekundäre Resistenz. Die Selektion bzw. Induktion einer resistenten Subpopulation innerhalb eines Tumors ist vermutlich der limitierende Faktor innerhalb der Chemotherapie und führt zu deren verminderten Effektivität.

Eine große Bandbreite von zellulären Mechanismen ist ursächlich für die Ausbildung einer Zytostatikaresistenz. Diskutiert werden neben unspezifischen Faktoren wie Hypoxie und langsamem Tumorwachstum die folgenden molekularen Mechanismen (Borst *et al.*, 2002; Gottesman, 2002):

1. **verminderte Aufnahme bzw. verstärkter Auswärtstransport des Zytostatikums**
2. intrazellulär verminderte Aktivierung oder vermehrte Inaktivierung des Substrates
3. Veränderungen der Zielstrukturen auf qualitativer und quantitativer Ebene
4. erhöhte Reparaturkapazität der Zelle
5. Umschaltung auf Ersatzstoffwechsel
6. Veränderungen in Zellzyklus-Kontrollen und Modulation der Apoptose
7. räumliche Trennung des Zytostatikums vom Wirkort durch Kompartimentierung

Geht man näher auf den **ersten Aufzählungspunkt** ein, so muß man zuerst die Aufnahme von Zytostatika in die Zelle ausführlicher betrachten.

Zwei wichtige Mechanismen der Substanzaufnahme sollen im Folgenden betrachtet werden:

- Hydrophile Substanzen, wie z.B. Nukleosidanaloga und Antifolate gelangen nur über entsprechende Transporter, Carrier oder hydrophile Poren in die Zellen. Resistenz in Bezug auf diese Substanzen beruht u. a. auf Mutationen innerhalb des Transportvehikels und einem damit verbunden Funktions- oder Lokalisationsdefekt. Es kommt dabei zur Ausbildung einer einfachen Zytostatikaresistenz (*single agent resistance*), da nur eine bestimmte Substanzklasse davon betroffen ist.
- Hydrophobe Substanzen, wie z.B. die Naturstoffe Vinblastin, Daunorubicin, Etoposid und Paclitaxel hingegen diffundieren entsprechend des Konzentrationsgefälles über die Plasmamembran in die Zelle, ohne dabei einen Transporter zu benötigen. Die einzige Möglichkeit, die Substanzkonzentration in der Zelle zu verringern, ist dabei der verstärkte aktive Transport aus der Zelle heraus in den extrazellulären Raum (Übersicht: Ambudkar *et al.*, 1999). Beteiligte Komponenten an diesem Auswärtstransport sind ABC (ATP-binding cassette)–Transporter, die eine Vielzahl von Substanzen unterschiedlichster Struktur und Wirkungsweise transportieren (Shen *et al.*, 1998). In malignen Neoplasien führt unter anderem ihre gesteigerte Transkription bzw. Amplifikation zur Ausbildung der sogenannten pleiotropen Zytostatikaresistenz oder auch Multidrugresistenz (*multidrug resistance*, MDR).

1.3 ABC-Transporter

Die ABC-Transporterfamilie stellte eine der größten Proteinfamilien dar und importiert bzw. exportiert ein großes Spektrum an Substanzen einschließlich Peptiden, Ionen, Sacchariden, Lipiden, Medikamenten und Xenobiotika (Borst *et al.*, 1999; Hipfner *et al.*, 1999). Mitglieder dieser Proteinfamilie finden sich in allen Organismengruppen (Archaea, Bacteria und Eukarya) und zeichnen sich durch ihre gemeinsame strukturelle Organisation aus. Während es bei den Prokaryoten sowohl Importer- als auch Exporter-Typen gibt, existieren bei den Eukaryoten nur exportierende ABC-Proteine (Saurin *et al.*, 1999). Ein typischer funktionell aktiver ABC-Transporter besteht aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen (TMD) und zwei hydrophilen, zytoplasmatischen Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD, ATP-Bindungskassette). Während die hochkonservierte ATP-Bindungskassette die Grundlage für einen energiegekoppelten Substrattransport entgegen eines Konzentrationsgradienten ist, erfolgt die Substraterkennung, –bindung und der –transport über Bereiche innerhalb der

Transmembrandomäne (Higgins, 1992; Schneider and Hunke, 1998).

Bisher sind 48 humane ABC-Transporter identifiziert worden. Die Gene kodieren entweder für einen vollständigen Transporter, der aus zwei TMDs und zwei NBFs besteht, oder nur für einen Halbtransporter (Dean *et al.*, 2001). Durch die Bildung eines Homo- bzw. Heterodimers kann aus dem letztgenannten ein funktionell aktiver Transporter gebildet werden. Entsprechend ihrer Sequenz- und Strukturhomologien werden die Gene der humanen ABC-Transporter in sieben Unterfamilien (ABCA bis ABCG) unterteilt. Nachfolgend soll nur auf einige Vertreter näher eingegangen werden.

Zur ABCB Gruppe gehört das humane Transportprotein P-Glykoprotein (MDR1), dessen nähere Beschreibung im Kap. 1.4 erfolgt (Chen *et al.*, 1986). Dem P-Glykoprotein sowohl genetisch als auch biochemisch eng verwandt ist das MRP (*multidrug resistance associated protein*; ABCC1)–Transportersystem. Dieses 190 kDa große, membranständige Protein wurde erstmals in einer zytostatika-resistenten Bronchialkarzinomzelllinie, in der P-Glykoprotein nicht nachgewiesen werden konnte, beschrieben. Es wird sowohl in Tumorzellen als auch im Normalgewebe exprimiert (Cole *et al.*, 1992) und transportiert mit Glutathion oder Anionen konjugierte Substanzen (Loe *et al.*, 1996; Borst *et al.*, 1999). In den folgenden Jahren wurden weitere Mitglieder der MRP-Familie entdeckt, die nach Abschluß des humanen Genomprojekts 10 Mitglieder umfaßt, von denen aber nur 6 bisher näher charakterisiert wurden (Übersichten in Dean *et al.*, 2001; Gottesman, 2002). Der Ende der neunziger Jahre beschriebene Halbtransporter BCRP (*breast cancer resistance protein*; ABCG2) besteht aus sechs Transmembrandomänen und einer Nukleotidbindungsstelle (Doyle *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999). Der in der zellulären Plasmamembran vorliegende Halbtransporter bildet mit sich selbst ein funktionell aktives Homodimer, welches eine große Bandbreite von hydrophoben Substanzen transportieren kann und die Resistenz gegenüber Mitoxantron und Topotecan vermitteln kann (Brangi *et al.*, 1999; Litman *et al.*, 2000; Rocchi *et al.*, 2000).

Neben ihren vielfältigen physiologischen Funktionen spielen ABC-Transportproteine auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung oder Therapie menschlicher Erkrankungen. Für eine erbliche Erkrankung, die auf den Defekt eines ABC-Transporters beruht ist die Zystische Fibrose (Mukoviszidose) zu nennen. Mutationen und ein damit verbundener Funktionsverlust des Chlorid-Ionenkanals CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sind ursächlich für dieses Leiden (Gadsby *et al.*, 2006). Ein für die Therapie von Neoplasien wichtiger Befund ist, daß für Mitglieder aus der Unterfamilie B, C und G ein Zusammenhang zur Zytostatikaresistenz in Tumorzellen hergestellt werden konnte (Tabelle 1; Gottesman und

Pastan, 1993).

Tabelle 1: ABC-Transporter assoziiert mit Zytostatikaresistenz (modifiziert nach Gottesman und Pastan, 1993)

Gen	Lokalisation	Chemotherapie-Substrate
<i>MDR1/P-Gp</i> (ABCB1)	Darm, Leber, Niere, Plazenta, Blut-Hirn- Schranke	Doxorubicin, Daunorubicin, Vincristin, Paclitaxel
<i>MRP1</i> (ABCC1)	ubiquitär	Vincristin, Doxorubicin, Daunorubicin, Kolchizin
<i>MRP2/cMOAT</i> (ABCC2)	Leber, Niere, Darm	Cisplatin, Etoposid, Methotrexat, Vincristin, Mitoxantron
<i>BCRP</i> (ABCG2)	Plazenta, Darm, Brust, Leber	Mitoxantron, Daunorubicin, Doxorubicin, Topotecan

Resistenzen gegenüber den vorstehend beschriebenen Zytostatika Daunorubicin und Doxorubicin wurden vor allem im Zusammenhang mit der Überexpression von MDR1 (Arnal *et al.*, 2000), MRP (Benderra *et al.*, 2000) und LRP (Den Boer *et al.*, 1999) gefunden.

1.4 P-Glykoprotein (ABCB1, MDR1)

Das 1976 erstmals in Kolchizin-resistenten CHO (*C*hinese *h*amster *o*vary)–Zellen beschriebene transmembranständige P (*P*ermeabilitäts)–Glykoprotein zählt zu den am besten untersuchten ABC-Transportern (Juliano *et al.*, 1976).

Das humane P-Glykoprotein wird durch das auf dem Chromosom 7q21.1 gelegene *MDR1* Gen kodiert und spielt als Mitglied der ABC-Transporterfamilie in der Eliminierung und Detoxifikation von diversen Substanzen eine wichtige Rolle (Schinkel, 1997; Johnson *et al.*, 2001). In einer Vielzahl von humanen zytostatika-resistenten Tumorzelllinien konnte eine Überexpression des *MDR1* Genprodukts nachgewiesen werden (Kartner *et al.* 1983; Riordan *et al.*, 1985). Desweiteren stellt P-Glykoprotein den ersten klonierten ABC-Transporter dar, für den durch Transfektion in Tumorzellen die Generierung eines MDR-Phänotyps (klassische Multidrugresistenz) gezeigt werden konnte (Shen *et al.*, 1986; Ueda *et al.*, 1987).

1.4.1 Lokalisation und Funktion

Das 170 kDa große Membranprotein besteht aus 1280 Aminosäuren (Abbildung 2), die zwei nahezu homologe Hälften mit je sechs Transmembransegmenten und einer ATP-Bindungskassette bilden. Eine flexible Polypeptidkette (*linker* Region) verbindet die beiden Bereiche miteinander. Posttranskriptionelle Modifikation des Proteins findet in Form von Glykosylierung und Phosphorylierung statt (Higgins *et al.*, 1997).

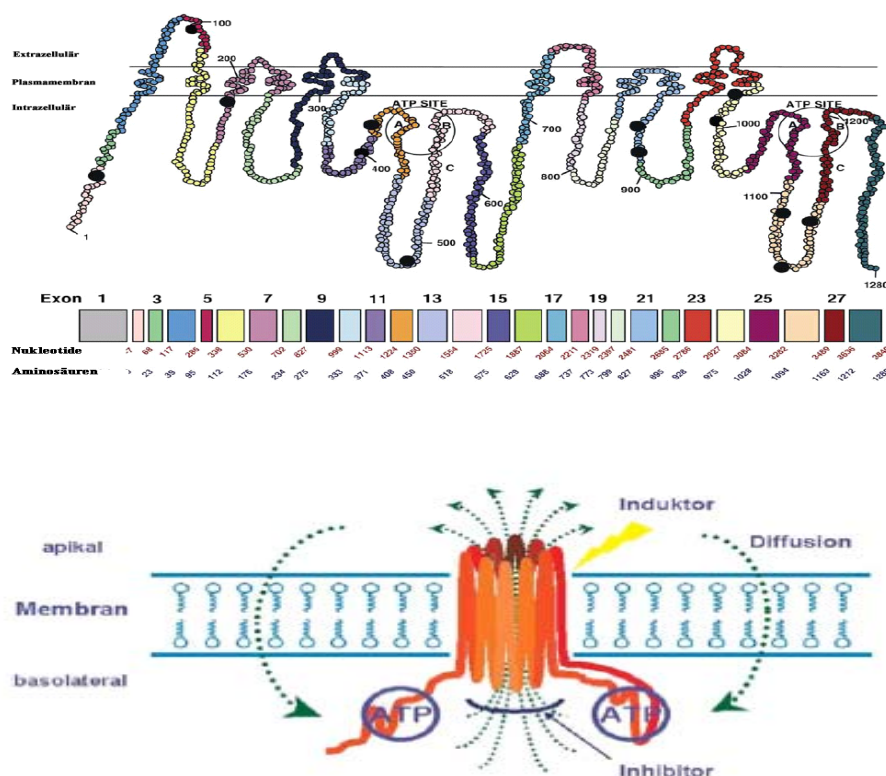


Abbildung 2: Darstellung der zweidimensionalen Struktur (verändert nach Ambudkar *et al.*, 2003) und Funktion von P-Glykoprotein (verändert nach Hoffmeyer *et al.*, 2000)

Eine physiologische P-Glykoprotein-Expression findet sich in der apikalen Membran von Epithelzellen, wie z.B. der Leber, Niere, der Blut-Hirn-Schranke und in der Plazenta (Thiebaut *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Lum *et al.*, 1995). Vornehmlich findet sich der Transporter also in Geweben, die eine exkretorische bzw. sekretorische Funktion ausüben oder denen eine besondere Schutzfunktion zukommt, aber auch in Leukozyten sowie in CD34⁺ Stammzellen des Knochenmarks konnte eine Expression von P-Glykoprotein nachgewiesen werden (Klimecki *et al.*, 1994; Gottesman *et al.*, 1996).

Das Spektrum der von P-Glykoprotein transportierten Substanzen ist groß, allen gemeinsam ist ihr hydrophober bzw. amphipatischer Charakter sowie ihre positive Ladung bei physiologischem pH-Wert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Beispiele für Substanzen, die durch P-Glykoprotein transportiert werden.

Substanzklasse	Beispiele
<i>Zytostatika</i>	Vinca Alkaloide (Vinblastin) Anthrazykline (Doxo-, Daunorubicin) Paclitaxel, Topotecan
<i>Antibiotika und zytotoxische Substanzen</i>	Kolchizin, Ethidiumbromid, Puromycin
<i>Steroide</i>	Aldosterol, Cortisol
<i>zyklische und lineare Peptide</i>	Valinomycin, Gramicidin
<i>HIV Proteaseinhibitoren</i>	Ritonavir, Indinavir
<i>Immunsuppressiva</i>	Cyclosporin A
<i>andere Substanzen</i>	Rhodamin 123, Digoxin (Herzglykosid)

Neben der intrinsischen MDR1-Expression können auch externe Faktoren zur Induktion der *MDR1*-Genexpression führen. Die Charakterisierung des *MDR1* Genpromotors führte zum Nachweis von definierten Sequenzbereichen, die durch solche Induktoren angesprochen werden und zur verstärkten Transkription des Gens führen (Jin *et al.*, 1998; Labialle *et al.*, 2002). Zu diesen Induktoren gehören auch Bestandteile der multimodalen Krebstherapie, wie Zytostatika und Strahlung (Chin *et al.*, 1990; Kioka *et al.*, 1992; Chaudhary *et al.*, 1993).

Für eine Vielzahl von Tumorentitäten, wie z. B. Tumoren des Gastrointestinaltrakts (Leber, Pankreas), das Mammarkarzinom und Tumoren des hämatopoetischen Systems (Leukämie, Lymphom) konnte eine Korrelation zwischen der MDR1-Überexpression und dem Ansprechen auf die Chemotherapie hergestellt werden (Trock *et al.*, 1997; Leith *et al.*, 1999). Demzufolge ist das Bestreben in der biomedizinischen Forschung groß, über die Hemmung des P-Glykoprotein-abhängigen Zytostatikatransports eine positive Wirkung auf den Erfolg einer Chemotherapie auszuüben.

1.4.2 Überwindung der P-Glykoprotein-abhängigen Multidrugresistenz

1.4.2.1 „Chemosensitizer“ / MDR-Modulatoren

In den letzten zehn Jahren wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um den P-Glykoprotein-abhängigen Resistenzphänotyp aufzuheben. Hauptaugenmerk lag anfänglich auf der Inhibierung der Transportfunktion durch Substanzen, die auch gleichzeitig Transportsubstrate für P-Glykoprotein sind und durch kompetitive Hemmung agieren. *In vitro* konnten mehrere Substanzgruppen als potentielle Modulatoren identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem Kalzium-Kanalblocker (z. B. Verapamil), Immunsuppressiva (z. B. Cyclosporin A), Calmodulin-Antagonisten, Antiarrhythmika und Steroidhormone. In klinischen Studien konnten diese Effekte jedoch nicht reproduziert werden, da z. B. Cyclosporin A und Verapamil durch ihre geringen Bindungsraten an P-Glykoprotein nur bei sehr hohen Serumkonzentrationen ihre Wirkung entfalten. Diese hohen Dosen führten jedoch zu massiven toxischen Nebenwirkungen und pharmakokinetischen Interaktionen mit anderen ABC-Transportern und Enzymen (Krishna *et al.*, 2000, Ferry *et al.*, 1996). Auch neuere und verbesserte MDR-Modulatoren vermochten in allen bisherigen klinischen Studien nicht zu überzeugen, so daß sie bisher noch nicht in Standardtherapieschemata aufgenommen wurden. Ein weiteres Manko dieser Substanzen stellte das Phänomen dar, daß Tumorzellen gegen die eingesetzten MDR-Modulatoren eine sogenannte tertiäre Resistenz entwickeln können.

1.4.2.2 RNA-Technologien zur Genregulation

Neben der Weiterentwicklung von niedermolekularen MDR-Modulatoren mit reduzierter Toxizität, werden auch andere alternative Wege zur Aufhebung der durch P-Glykoprotein hervorgerufenen Multidrugresistenz verfolgt. Dazu gehören auf RNA-Technologie-basierende gentherapeutische Strategien in Form der Applikation von *Antisense*-Oligonukleotiden (ASO) bzw. Ribozymen, die gegen die mRNA von MDR1 gerichtet sind. Unter Nutzung dieser Techniken konnte 1989 erstmals die MDR1 mRNA-Expression durch den Einsatz von Methylphosphonat *Antisense*-Oligonukleotiden erfolgreich moduliert werden (Vasanthakumar *et al.*, 1989). In weiteren Ansätzen mit Ribozymen und *Antisense*-Oligonukleotiden konnte die MDR1 mRNA-Expression moduliert werden (Liu *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1994). Durch ein von Holm und Kollegen konstruiertes und in die daunorubicin-resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB eingebrachtes *Hammerhead*-Ribozym

wurde eine Erniedrigung der MDR1 mRNA-Expression erreicht, die mit einer Reversion des Resistenz einherging (Holm *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1995).

Eine weitere Methode zur selektiven und spezifischen Geninhibition auf posttranskriptioneller Ebene stellt die neue und zur Zeit intensiv untersuchte RNA-Interferenz Technologie dar. In dem sich anschließenden Kapitel soll näher auf den zugrundeliegenden Mechanismus und seine Nutzung in der biomedizinischen und molekularbiologischen Grundlagenforschung eingegangen werden, da er in dieser Arbeit Anwendung fand.

1.5 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, der sich in Pflanzen, *Drosophila melanogaster* über *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bis hin zum Säugetier findet. Funktionell wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) eine Degradation der komplementären, zellulären RNA induziert und die Translation des entsprechenden Proteins reprimiert. Dieser posttranskriptionelle Vorgang erfolgt sequenzspezifisch und dient erstens dem Schutz des Genoms vor Transposons sowie exogenen Nukleinsäuren (Replikationsintermediate in der viralen Vermehrung) und zweitens der Regulation der Genexpression durch endogene *micro* RNAs (miRNAs) (Übersicht: Hannon, 2002).

Das oben beschriebene Phänomen konnte erstmals bei dem Versuch, die Farbe von Petunien zu intensivieren, beobachtet werden. Bei dieser Studie kam es durch das Einschleusen des Gens für ein Enzym der Anthocycansynthese statt zu einer Farbintensivierung zu einer Aufhellung der Blütenpigmentierung durch die Reduktion des endogenen farbstoffproduzierenden Enzyms (Napoli *et al.*, 1990). Dieses pflanzliche Phänomen, dessen Grundlagen bis dahin noch nicht verstanden waren, bezeichnet man als *Cosuppression* oder *PTGS* (*posttranscriptional gene silencing*). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Pilzen gemacht werden. Dort sprach man vor der Beschreibung des RNA-Interferenz Mechanismus von *Quelling* (engl. unterdrücken). Die Aufklärung dieser Beobachtungen und die Prägung des Begriffs RNA-Interferenz erfolgt durch Fire *et al.* Sie konnten in der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) erstmals belegen, daß es durch 300 - 1000 bp lange doppelsträngige RNAs zu einer spezifischen und effektiven Inhibition der Genexpression kommt (Fire *et al.*, 1998). Dabei zeigte sich, daß die dsRNA zehnmal wirkungsvoller als die Applikation einer einzelsträngigen *Sense*- oder *Antisense*-RNA war.

1.5.1 Genereller Mechanismus (Mammalia)

Der erste Schritt (Initiationsschritt) in dieser zellulären Kaskade (Abbildung 3) ist die Prozessierung von zytoplasmatischer, doppelsträngiger RNA in 21-23 nt lange Fragmente, den sogenannten siRNAs (*small interfering RNA*). Dies erfolgt durch das Enzym Dicer, welches eine katalytische RNase III Domäne und eine dsRNA Bindungsdomäne (dsRBD) enthält (Cerutti *et al.*, 2000). Charakteristisch für die gebildeten siRNAs sind die durch die Prozessierung entstandenen Modifikationen in Form eines 5'-Monophosphats, einer 3'-Hydroxylgruppe und einem zwei Nukleotide langen Überhang am 3'-Terminus (Zamore *et al.*, 2000; Conrad *et al.*, 2002). Nun erfolgt die ATP-abhängige Entwindung der siRNA durch eine Helikase und die Inkorporation in den sogenannten „*RNA induced silencing complex*“ (RISC). Der nun separat vorliegende *antisense*-Strang dient als Matrize zur Lokalisation und Bindung der sequenzhomologen RNA durch Watson-Crick-Basenpaarung. Die sich anschließende endonukleolytische Spaltung erfolgt ausgehend vom 5'-Terminus zwischen dem 10. und 11. Nukleotid. Der Abbau wird durch Exonuklease-Aktivitäten komplettiert (Elbashir *et al.*, 2001; Scherr *et al.*, 2003). Neben der dsRNA, die durch exogene Faktoren wie Viren in den Organismus gelangt, gibt es weiterhin endogene dsRNA, die wichtige regulatorische Funktionen innerhalb der Zelle ausübt. Diese sogenannten miRNAs haben eine Größe von 22 Nukleotiden und werden aus etwa 70 Nukleotid langen pre-miRNAs mit einer imperfekten Haarnadelstruktur durch den Dicer prozessiert. Durch partielle oder komplette Bindung der miRNAs an die mRNA kommt es zu einer Translationshemmung (bei 50 - 85 % Homologie) oder zur Degradation (bei 100% Homologie) derselben (Bartel, 2004). Komponenten dieser Kaskade sind noch an weiteren Prozessen wie der Bildung von Heterchromatin beteiligt, welche durch *repeat associated small interfering RNAs* (rasiRNAs) oder heterochromatischen RNAs ausgelöst wird, was zu einer transkriptionellen Gensuppression führen kann (Lippmann und Martienssen, 2004)

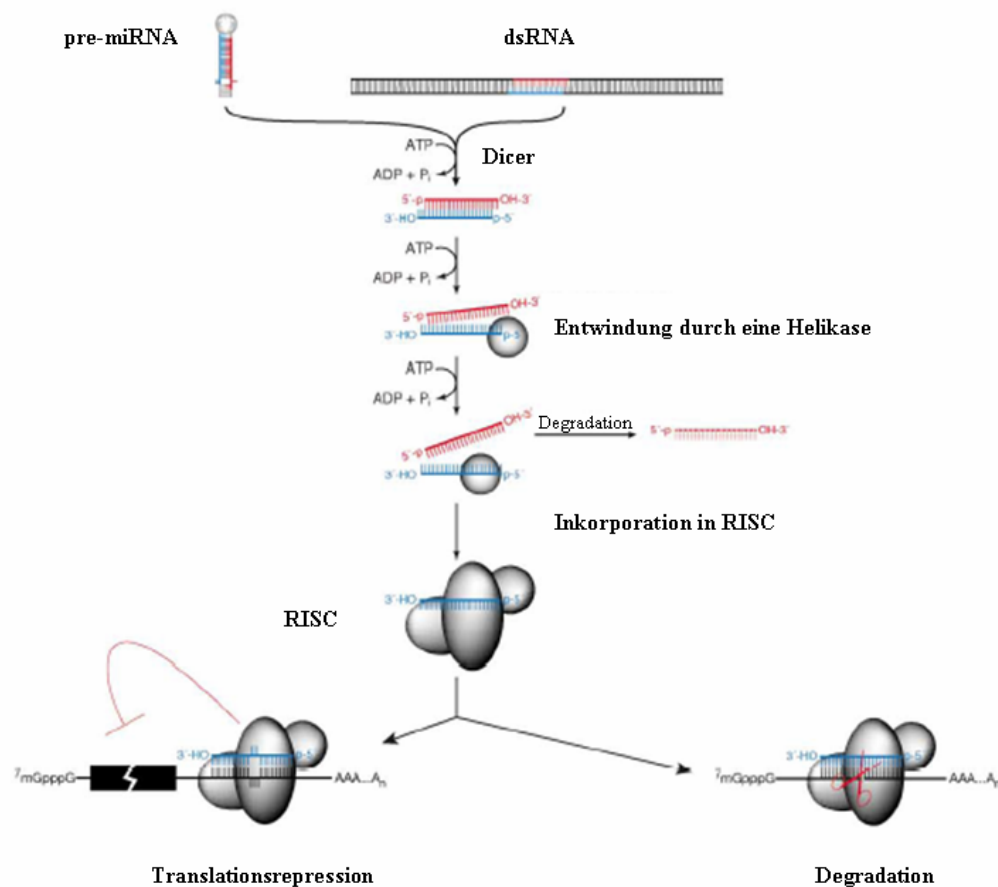


Abbildung 3: Genereller Mechanismus der RNA-Interferenz (verändert nach Schwarz *et al.*, 2003)

Endogene pre-miRNA oder exogene dsRNA werden im ersten Schritt durch den Dicer in 21-23 nt lange Fragmente geschnitten. Diese sogenannten siRNAs werden anschließend durch eine Helikase entwunden und in den RISC inkorporiert. Der nun separat vorliegende *antisense*-Strang dient als Matrice zur Lokalisation und Bindung der sequenzhomologen RNA durch Watson-Crick-Basenpaarung. Die endonukleolytische Spaltung erfolgt ausgehend vom 5'-Terminus zwischen dem 10. und 11. Nukleotid. Der Abbau wird durch Exonuklease-Aktivitäten komplettiert.

1.5.2 Bedeutung der RNA-Interferenz für die Forschung

Nach der Entdeckung des RNA-Interferenz Mechanismus wurde sehr schnell sein Potential für die funktionelle Genomanalyse erkannt, entsprechende Methoden entwickelt und erfolgreich in Protozoen und vielen höheren Eukaryoten zur Regulation der mRNA-Expression genutzt (Montgomery *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 1998; Cogoni *et al.*, 1999). In humanen Zellen konnte jedoch der Mechanismus lange Zeit nicht genutzt werden, da lange dsRNAs in diesen Zellen zur sequenzunabhängigen Aktivierung des antiviralen Interferonsystems führt, wodurch es zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase PKR und im weiteren Verlauf zur unspezifischen Hemmung der Proteinbiosynthese kommt. Die ebenfalls aktivierte 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase verursacht ferner eine unspezifische Hydrolyse der mRNA und rRNA durch die Aktivierung der RNase L, was letzten Endes zum Zelltod führt

(Stark *et al.*, 1998). Mit fortschreitenden Verständnis sowohl auf genetischer als auch biochemischer Ebene ließen sich die Prozesse, die zur RNA-Interferenz führen, entschlüsseln. Es zeigte sich, daß dsRNAs von 21 bis 28-Nukleotidlänge (siRNAs) die sequenzspezifische Degradation der mRNAs „lenkt“. Die Aufklärung der Struktur von siRNAs bereitete den Weg für den Einsatz in humanen Zellen. Den tatsächlichen Durchbruch brachten aber Studien von Elbashir und Tuschl, die zeigen konnten, daß synthetische dsRNAs von 21 nt Länge, die direkt in die humane Zelle eingebracht werden, zu einer sequenzspezifischen Hemmung der Genexpression führt. Seitdem können „*knock-down*“ Phänotypen in Mammalia-Zellen auf verschiedene Arten hergestellt werden (Elbashir *et al.*, 2001). Zum einen können synthetische siRNAs exogen mit Hilfe diverser Transfektionsreagenzien in die Zelle eingebracht werden. Da jedoch synthetische siRNAs bis dato noch relativ teuer sind und der daraus resultierende Phänotyp nur etwa 7-10 Replikationszyklen erhalten bleibt, ist man in jüngster Vergangenheit auf Vektoren, die siRNAs oder sogenannte shRNAs (*short hairpin* RNA) exprimieren, übergegangen (Elbashir *et al.*, 2002; Holen *et al.*, 2002; Brummelkamp *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, stabil transfizierte Zellen zu selektionieren, die auch nach mehreren Monaten noch eine effiziente Gensuppression zeigen (Abbildung 4). Die Etablierung der RNA-Interferenz als Technik zur gezielten Modulation der Expression von humanen Genen *in vitro* folgten recht schnell erste Berichte über Anwendungen im Mausmodell. So konnte durch die Übertragung von sequenzhomologen siRNAs über die hydrodynamische Injektion in die Schwanzvene von Mäuse diverse Reportergene inhibiert werden (McCaffrey *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002).

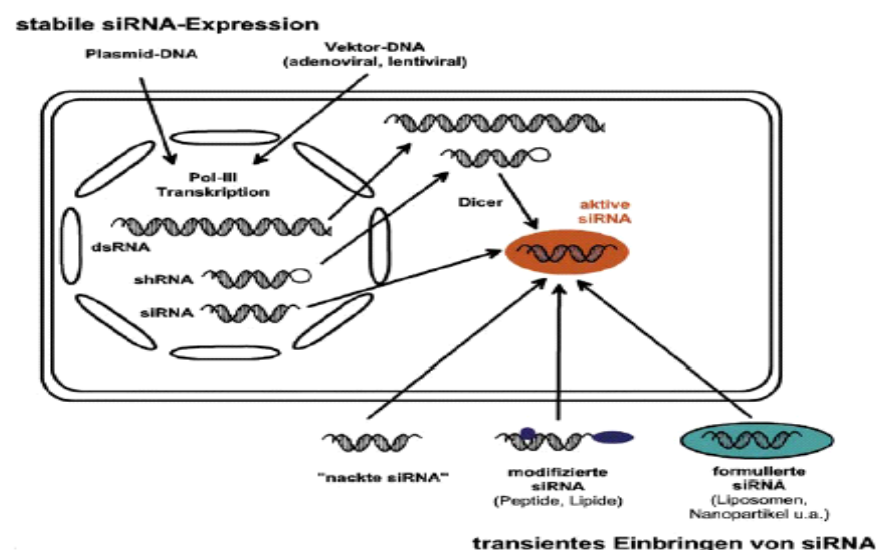


Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Arten, aktive siRNA in die Zelle einzubringen bzw. zu generieren (nach Wacheck und Vornlocher, 2003).

1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

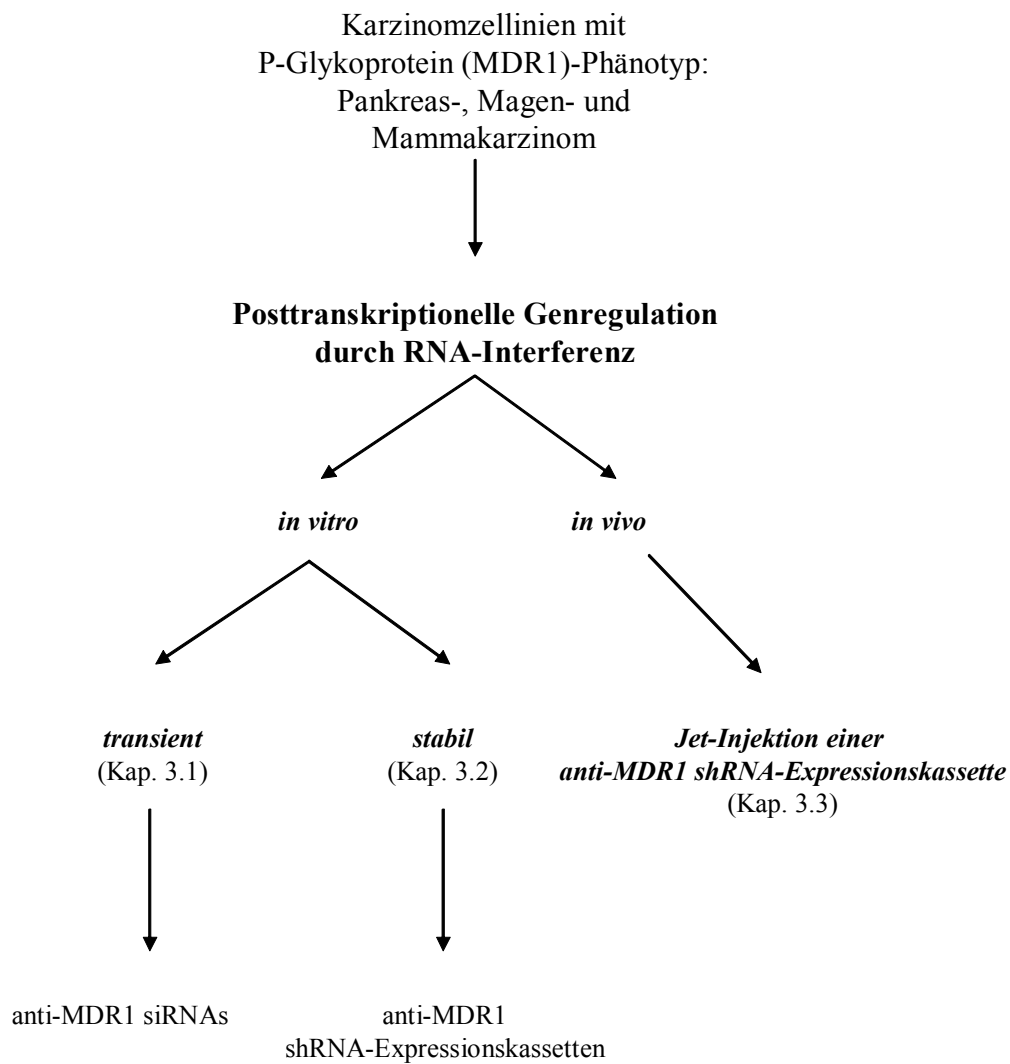
Bei der Therapie von neoplastischen Erkrankungen gibt es zwei grundlegende Probleme zu lösen. Erstens müssen die molekularen Mechanismen der Tumorprogression aufgeklärt werden, um spezifischere Behandlungsschemata mit geringeren Nebenwirkungen anbieten zu können. Zweitens ist die Modulierung von bereits bekannten Krebs- und Resistenz-assoziierten Faktoren in einem gentherapeutischen Ansatz zur Unterstützung und Verbesserung der konventionellen Therapie von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich mit dem zweiten Punkt und hier im Speziellen mit dem ABC-Transporter MDR1/P-Glykoprotein, für den ein Zusammenhang zur Zytostatikresistenz in Tumorzellen gezeigt werden konnte, beschäftigt. Ziel war die Modulierung der Genexpression mittels RNA-Interferenz zur Reversion des Multidrugresistenz-Phänotyps sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Als Modellsystem für diese Untersuchungen wurden drei humane Karzinomzelllinienpaare, bestehend aus einer parentalen, sensiblen sowie einer resistenten P-Glykoprotein-überexprimierenden Sublinie, ausgewählt.

Die folgenden Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Kann durch chemisch synthetisierte anti-MDR1 siRNAs die Expression der MDR1 mRNA und des P-Glykoproteins moduliert werden?
- Wie verändern sich die Zellen nach der Modulation hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber den Selektionszytostatika?
- Ist die Ausprägung und Dauer der Inhibition Zelltyp- und/oder Zielsequenz-abhängig?
- Kann eine dauerhafte und vollständige posttranskriptionelle Inhibition der MDR1 mRNA-Expression durch shRNA-exprimierende Vektoren erreicht werden?
- Kann dadurch eine komplette Aufhebung der Zytostatikresistenz erreicht werden?
- Kann in den aus der chemoresistenten Mammakarzinomzelllinien MaTu/ADR-abgeleiteten Maustumoren durch die intratumorale Applikation von anti-MDR1 shRNA-kodierende Vektoren die Genexpression von MDR1 inhibiert werden? Wie stark ist diese Inhibition und wann ist sie am stärksten?
- Führt die intratumorale Applikation von anti-MDR1 shRNA-kodierenden Vektoren mittels Jet-Injektion im *in vivo*-Modell zu einer Sensitivierung der Zellen? Kommt es unter der Gabe von Doxorubicin zur Remission des Tumorwachstums?

In der nachfolgenden Projektskizze findet sich eine grobe Übersicht über die einzelnen Strategien, die zur Überwindung des P-Glykoprotein-abhängigen Resistenzphänotyps verfolgt wurden.



2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biologisches Material

2.1.1.1 Antikörper

monoclonal antibody to P-glycoprotein (C219)

Alexis Biochemicals

mouse anti-Actin (monoclonal antibody)

Chemicon[®] International, Inc.

ImmunoPure[®] goat anti-Mouse IgG, (H+L), peroxidase
conjugated

Perbio Science Deutschland
GmbH

2.1.1.2 Humane Karzinomzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Karzinomzelllinien wurden vom Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin und vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin bereitgestellt.

Tabelle 3: Humane Karzinomzelllinien

Bezeichnung	Ursprungsgewebe und Selektion	Referenz
EPP85-181P	Pankreaskarzinomzelllinie	Lage <i>et al.</i> , 2002
EPP85-181RDB	Daunorubicin-resistente Sublinie	Lage <i>et al.</i> , 2002
EPG85-257P	Magenkarzinomzelllinie	Dietel <i>et al.</i> , 1990
EPG85-257RDB	Daunorubicin-resistente Sublinie	Lage <i>et al.</i> , 2000
MaTu	Mammakarzinomzelllinie	Widmaier <i>et al.</i> , 1974
MaTu/ADR	Doxorubicin-resistente Sublinie	Stein <i>et al.</i> , 1997

2.1.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Transformation wurden die folgenden *E. coli* Stämme und Plasmide verwendet:

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
GT116 (InvivoGen)	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recAI endAI ΔsbC-sbcD</i>
TOP10 (Invitrogen)	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recAI deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1nupG</i>

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp
pCR [®] 2.1 (Invitrogen)	<i>lacZα fl ori Kan^r Amp^r pUCori</i>
psiRNA-hH1zeo (InvivoGen)	<i>H1 prom Zeo^r pMB1 ori</i>

2.1.2 Chemikalien und Fertiglösungen

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ erworben.

Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	Qbiogene
Agarose Ultra Pure [™]	Invitrogen GmbH
Amidoschwarz (naphthol blue black)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA
Antibody Diluent, Background Reducing	DakoCytomation
Bacto [™] Agar	Difco Laboratories
Bacto [™] Hefeextrakt	Difco Laboratories
Bacto [™] Trypton	Difco Laboratories
Blue/Orange 6 x Loading Dye	Promega GmbH
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH
Color Markers (high range, 29-205 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Complete (Proteinase-Inhibitor)	Roche Diagnostics GmbH

Daunorubicin Hydrochlorid (Daunoblastin [®])	Pfizer Deutschland
Denhardt's Reagenz	Fluka
2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs, je 25 mM)	Roche Diagnostics GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Doxorubicin Hydrochlorid Lsg. (Adriblastin [®])	Cell Pharm GmbH
Entwickler RP X-OAT EX	Eastman Kodak Company
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Merck KgaA
ExpressHyb [™] Hybridization Solution	BD Biosciences – Clontech
Fetuin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fixierer RP X-OMAT LO	Eastman Kodak Company
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Formaldehyd (37 %)	J.T. Baker
Formamid	Merck KgaA
D(+)-Glukose-Lösung (45 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin (200 mM)	Cambrex Bio Science
Glyzerin (pflanzlich)	SERVA Electrophoresis GmbH
Harnstoff	Merck KgaA
H-Insulin (40 IE/ml), Insuman [®] Rapid	Aventis Pharma Deutschland
LSAB+, HRP	DakoCytomation
Leibovitz L-15 Medium ohne L-Glutamin	BioWhittaker Europe
Magermilch (<i>skim milk</i>)	Difco Laboratories
Mayer's Hematoxylin	DakoCytomation
MEM-Vitamine (100 ×)	Biochrom AG
Methanol	J.T. Baker
Molekularbiologisches Wasser	Eppendorf AG
3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck KgaA

Natriumazetat	Merck KgaA
Natriumbikarbonat 7,5 % (w/v)	Biochrom AG
Natriumchlorid	Merck KgaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KgaA
Natriumhydrogenkarbonat	Merck KgaA
NorthernMax [®] Formaldehyde Load Dye	Ambion (Europe) Ltd
OptiMEM [®] mit GlutaMax [™] I	Invitrogen GmbH
D-PBS (10 x)	Invitrogen GmbH
Primary Mouse Negative Control	DakoCytomation
2-Propanol	J.T. Baker
RNAlater [®]	Ambion (Europe) Ltd
VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin	Biochrom AG
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, TMEDA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Transferrin	Roche Diagnostics GmbH
Trasyol [®] 0,5 (Infusionslösung)	Bayer Vital
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KgaA
Trichloressigsäure (TCA)	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck KgaA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin-EDTA-Lösung 0,5 % / 0,2 % (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom AG
Tween [®] 20	SERVA Electrophoresis GmbH
Zeocin [™]	Invitrogen GmbH

2.1.3 Enzyme

Ampli Taq Gold™ (5 U/μl)

*Ase*I

*Bbs*I

Oligofectamine™ Reagent

T4 DNA Ligase

T4 Polynukleotidkinase

RNase, DNase-frei (500 μg/ml)

SuperFect® Transfection Reagent

Perkin Elmer

New England Biolabs® Inc.

New England Biolabs® Inc.

Invitrogen GmbH

New England Biolabs® Inc.

Invitrogen GmbH

Roche Diagnostics GmbH

Qiagen GmbH

2.1.4 Kits

Decade™ Marker System

ECL™ Western Blotting Analysis System

EndoFree Plasmid Maxi Kit

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I

Megaprime™ DNA Labelling System

psiRNA-hH1zeo Kit

RNeasy® mini Kit

Qiaprep® miniprep

QIAquick Gel Extraction Kit

Quick Ligation™ Kit

SuperSignal® West Pico

Chemiluminescent Substrate

SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR

TOPO TA Cloning® Kit (mit pCR®2.1)

Western Blot Recycling Kit

Wizard® SV Genomic DNA Purification System

Ambion (Europe) Ltd

Amersham Biosciences Europe GmbH

Qiagen GmbH

Roche Diagnostics GmbH

Amersham Biosciences Europe GmbH

InvivoGen

Qiagen GmbH

Qiagen GmbH

Qiagen GmbH

New England Biolabs® Inc.

Perbio Science Deutschland GmbH

Invitrogen GmbH

Invitrogen GmbH

Alpha Diagnostic

Promega GmbH

2.1.5 Geräte

BioKineticsReader EL 340 (ELISA)

Brutschrank Steri Cult 200

Brutschrank für Bakterienkultur

Digital Printer UP-D860E/Gel Print 2000i

DNA Thermal Cycler 480

Durchlicht-Mikroskop LSM II

Gelelektrophoresekammern:

-mini Sub[®] Cell GT

-Wide mini-Sub[®] Cell GT

-mini Protean II[™]

Hybridisierungsofen OV1

Inverses Forschungsmikroskop IMT-2

Laborwaage BL1500S

LightCycler[™]

Magnetrührer RCT Basic

MP 220 pH-Meter

Multikanalpipette

Nalgene[™] Cryo.s 1 °C Freezing Container

Pipetboy acu

Photometer GeneQuant II

Reinstwasseranlage Milli-RO 10/Milli-Q Plus

SmartSpec[™] Plus Spectrophotometer

Steri-Cult 200 Incubator

Stromversorgungsgerät Power Pac 200

Thermomixer 5436

Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell

Trio Thermoblock

Schüttelinkubator WT16

Steril-Bank Lamin Air HBB 2472

UV Crosslinker UVC1000

Bio-Tec[™] Instruments

Lifescience

Heraeus Instruments GmbH

Sony

Perkin Elmer

Zeiss

Bio-Rad Laboratories GmbH

Bio-Rad Laboratories GmbH

Bio-Rad Laboratories GmbH

Biometra

Olympus Optical Co. GmbH

Sartorius AG

Roche Diagnostics GmbH

IKA-Labortechnik

Mettler Toledo GmbH

Eppendorf

Nalgene Europe Ltd.

Integra Bioscience

Amersham Biosciences Europe GmbH

Millipore Corp.

Bio-Rad Laboratories GmbH

Forma Scientific, Inc.

Bio-Rad Laboratories GmbH

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

Bio-Rad Laboratories GmbH

Biometra

Biometra

Heraeus Instruments GmbH

Hofer

UV-Transilluminator	MWG-Biotech AG
Varioklave® Dampfsterilisator Typ 300	
Vortex VF 2	IKA-Labortechnik
Wasserbad 1002	GFL mbH
<u>Zentrifugen:</u>	
- Kühlzentrifuge J2-MC (Rotor: JA25.5 und JA 14)	Beckman Coulter
- Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf AG
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	HBG

2.1.6 Nukleinsäuren

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH
Oligonukleotide für PCR (Tabelle 6)	MWG Biotech AG
Oligonukleotide für shRNAs (Tabelle 7)	MWG Biotech AG
RNA-Längenstandard 0,24-9,5 kb	Life Technologies
siRNAs (Tabelle 8)	Dharmacon, Inc.

Tabelle 6: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Aldolase fwd	ATC GTG GCT GCA CAT GAG TC
Aldolase rev	GCC CTT GTC TAC CTT GAT GC
MDR1 fwd	CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC
MDR1 rev	CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG
MDR-C <i>antisense</i>	AGT GCT TGT CCA GAC AAC A
OL381 fwd	CAG AAA AAA AGG ATC TCA AGA AG
OL381 rev	CCC TAA CTG ACA CAC ATT CC
U6snRNA	TAT GGA ACG CTT CAC GAA TTT GC

Zur *in vitro* Transkription von shRNA mittels Expressionsvektor wurden in der vorliegenden Arbeit, ausgehend von der 4,8 kb großen MDR1 mRNA (NM_000927.2), drei unterschiedliche *target*-Sequenzen verwendet (Tabelle 7).

Der *sense*-Strang wurde am 5'-Ende mit einem A, entsprechend dem Transkriptionsanfang des H1-Promotors synthetisiert. Die Überhänge am 5'-Terminus sind kompatibel mit der

*Bbs*I-Restriktionsschnittstelle und wurden wie unten abgebildet zusammengesetzt. Zur Wiederherstellung der T5-Terminationssequenz, wurde der *sense*-Strang am 3'-Terminus mit einem TT-Überhang synthetisiert.

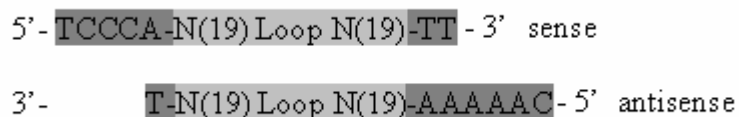


Tabelle 7: Sequenzen der für die shRNA Klonierung verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Referenzsequenz / Position
shRNA MDR-A fwd	TCC CAG AAG GAA AAG AAA CCA ACT CCA CCA GTT GGT TTC TTT TCC TTC TT	NM_000927.2, nt 503-523 Stege <i>et al.</i> , 2004
shRNA MDR-A rev	CAA AAA GAA GGA AAA GAA ACC AAC TGG TGG AGT TGG TTT CTT TTC CTT CT	NM_000927.2, nt 503-523 Stege <i>et al.</i> , 2004
shRNA MDR-B fwd	TCC CAA ATG TTG TCT GGA CAA GCA CCA CCT GCT TGT CCA GAC AAC ATT TT	NM_000927.2, nt 3050-3070 Stege <i>et al.</i> , 2004
shRNA MDR-B rev	CAA AAA AAT GTT GTC TGG ACA AGC AGG TGG TGC TTG TCC AGA CAA CAT TT	NM_000927.2, nt 3050-3070 Stege <i>et al.</i> , 2004
shRNA MDR-C fwd	TCC CAT GTT GTC TGG ACA AGC ACT TTC AAG AGA AGT GCT TGT CCA GAC AAC ATT	NM_000927.2, nt 3052-3072
shRNA MDR-C rev	CAA AAA TGT TGT CTG GAC AAG CAC TTC TCT TGA AAG TGC TTG TCC AGA CAA CAT	NM_000927.2, nt 3052-3072
shRNA MDR-D fwd	TCC CAT GTT GTC TGG ACA AGC ACT CCA CCA GTG CTT GTC CAG ACA ACA TT	NM_000927.2, nt 3052-3072

shRNA MDR- D rev	CAA AAA TGT TGT CTG GAC AAG CAC TGG TGG AGT GCT TGT CCA GAC AAC AT	NM_000927.2, nt 3052-3072
shRNA GFP fwd	TCC CAA CTA CCA GCA GAA CAC CCC CCA CCG GGG TGT TCT GCT GGT AGT TT	U55762, nt 540-565
shRNA GFP rev	CAA AAA ACT ACC AGC AGA ACA CCC CGG TGG GGG GTG TTC TGC TGG TAG TT	U55762, nt 540-565

Tabelle 8: Sequenzen der verwendeten siRNAs

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Referenzsequenz / Position
siRNA MDR- A <i>sense</i>	GAA GGA AAA GAA ACC AAC U dT dT	NM_000927.2, nt 503-523 Nieth <i>et al.</i> , 2003
siRNA MDR- A <i>antisense</i>	AGU UGG UUU CUU UUC CUU C dT dT	NM_000927.2, nt 503-52 Nieth <i>et al.</i> , 2003
siRNA MDR- B <i>sense</i>	AAU GUU GUC UGG ACA AGC A dT dT	NM_000927.2, nt 3050-3070 Nieth <i>et al.</i> , 2003
siRNA MDR- B <i>antisense</i>	UGC UUG UCC AGA CAA CAU U dT dT	NM_000927.2, nt 3050-3070 Nieth <i>et al.</i> , 2003
siRNA Luciferase <i>sense</i>	CGU ACG CGG AAU ACU UCG A dT dT	X65324, nt 153-173 Muratovska <i>et al.</i> , 2004
siRNA Luciferase <i>antisense</i>	UCG AAG UAU UCC GCG UAC G dT dT	X65324, nt 153-173 Muratovska <i>et al.</i> , 2004

2.1.7 Radionukleotide

$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 10 mCi/ml (3000 Ci/mmol)

Amersham Biosciences Europe
GmbH

$\gamma^{32}\text{P}$ dATP 50 μCi (je Tip)

Amersham Biosciences Europe
GmbH

2.1.8 Software

Adobe Photoshop 7.0.1

Adobe Systems Inc.

BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

GraphPad Prism® 3.02

GraphPad Software

Kineticale Version 2.12 (ELISA-Reader)

Bio Tek

LightCycler Software 3.0

Roche

Microsoft® Office 2003

Microsoft Corporation

Microsoft® Internet Explorer 6.0

Microsoft Corporation

mfold

<http://bioinfo.math.rpi.edu>

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wie serologische Pipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Eppendorf bezogen. Von der Firma Falcon wurden die Materialien für die Zellkultur wie Kultivierungsgefäße, serologische Pipetten und Proberöhrchen verwendet. Glasgefäße wurden bei der Firma Schott bestellt.

Chromatographiepapier 3MM CHR

Whatman

Einfrierröhrchen Cellstar Cryo.s

Greiner Bio-One GmbH

Einmal-Küvetten Plastibran®

Brand GmbH + Co KG

Handschuhe SafeSkin SatinPlus und

Kimberley-Clark Corp.

Hyperfilm™ ECL

Amersham Biosciences Europe
GmbH

Kodak BioMax MR Film

Eastman Kodak Company

Nylontransfermembran Hybond™-N⁺

Amersham Biosciences Europe
GmbH

Protran BA 85 Zellulosenitrat

Schleicher & Schuell

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilisierung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden im Autoklaven (30 min, 121 °C, 2 bar) sterilisiert und von DNase-Aktivität befreit. Glasgeräte wurden zum Teil bei trockener Hitze sterilisiert (3 h, 180 °C). Hitzelabile Lösungen wurden durch Filtration (Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm) sterilisiert.

2.2.2 Methoden der eukaryotischen Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von humanen Karzinomzellen

Die Standardkultivierung der humanen Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181 sowie der humanen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257 erfolgte in 25 cm² Zellkulturflaschen mit modifiziertem Leibovitz L15-Medium. Die humane Mammakarzinomzelllinie MaTu hingegen wurde mit modifiziertem RPMI 1960-Medium kultiviert. Die Zellen wurden in einem Zellkulturschrank bei 37 °C in einer mit 5 % CO₂ versetzten, wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen. Mediumwechsel wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Weiterhin wurden die adhärent wachsenden Zellen je nach Konfluenz alle 7-10 Tage passagiert. Der Vorgang des Passagierens wurde folgendermaßen durchgeführt: Im ersten Schritt wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml 1 × PBS gespült. Danach wurden die Zellen mit 2 ml 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und solange bei 37 °C inkubiert, bis sich alle Zellen vom Untergrund gelöst hatten. Anschließend wurde die gewünschte Zellmenge in der Kulturflasche belassen und 5 ml Medium zugegeben.

Die chemoresistenten Varianten wuchsen unter den folgenden Zytostatikakonzentrationen:

2,5 µg/ml Daunorubicin	EPP85-181RDB und EPG85-257RDB
0,1 µg/ml Doxorubicin	MaTu/ADR

Vor der Verwendung in der Zellkultur wurde dem RPMI 1960-Medium noch 10 % steriles FKS hinzugefügt.

Das L15-Medium wurde durch die folgenden Supplemente komplettiert:

Modifiziertes L-15 Medium

L15-Medium	500 ml
Fetuin	3,75 mg
FKS	10 %
D(+)-Glukose (45 %)	0,05 % (w/v)
L-Glutamin	1,0 mM
Insulin	40 IE
NaHCO ₃	0,1125 % (w/v)
MEM-Vitamine	1 x
Transferrin	1,25 mg
Trasyol [®]	0,002 % (v/v)

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von humanen Karzinomzellen

Die Zellen wurden bei etwa 80 %iger Konfluenz trypsinisiert, mit dem gleichen Volumen Medium versetzt und 5 min bei 950 rpm und Raumtemperatur (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 95 % FKS mit 5 % DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen und über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam auf -80 °C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C oder bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension schnell aufgetaut und in ein Kulturgefäß mit dem entsprechenden Medium überführt. Nach spätestens 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von Zusätzen wie Zytostatika und Antibiotika.

2.2.2.3 Transfektion humaner Karzinomzelllinien***2.2.2.3.1 Transiente Transfektion mittels Oligofectamine (Invitrogen)***

Für die Transfektion von humanen Tumorzellen mit siRNA Duplexen wurde im ersten Schritt die Konzentration der siRNA Einzelstränge auf 50 µM eingestellt. In der Hybridisierungsreaktion wurden 30 µl jedes Einzelstrangs mit 15 µl 5 x Hybridisierungspuffer versetzt, bei 90 °C für 1 min denaturiert und anschließend für 1 h bei 30 °C inkubiert. Für die eigentliche Transfektionsreaktion wurden 10 µl siRNA Duplexe (20 µM) mit 175 µl OptiMEM versetzt (Angaben je Kavität einer 6-well Platte). In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden 12 µl OptiMEM mit 3 µl Oligofectamine versetzt. Beide Lösungen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. An die Vereinigung der beiden

Lösungen schloß sich eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit 800 µl OptiMEM versetzt. Nun wurden 200 µl der Lösung hinzugegeben (Konzentration in der Kavität = 200 nM) und für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Eine längere Inkubationszeit wurde nicht gewählt, da bekannt ist, daß die Aufnahme von siRNAs ihr Maximum nach 2–4 h erreicht (Holen *et al.*, 2002). Zur Beendigung der Transfektionsreaktion wurden 500 µl Zellkulturmedium mit 30 % FKS zugegeben.

2.2.2.3.2 Stabile Transfektion mittels SuperFect (Qiagen)

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-well Platten so ausgesät, daß zwei Kavitäten für die Transfektion zur Verfügung standen sowie zwei für die Kontrollen: Die Kultivierung erfolgte bis zu einer Konfluenz von 50 bis 70 %. Im ersten Schritt der Transfektion (Angaben je Kavität) wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 65 µl OptiMEM gemischt, die Lösung auf 75 µl mit 10 mM Tris-HCl (steril) aufgefüllt und gut vermischt. Nach der Zugabe von 10 µl Superfect und 5-maligem Auf- und Abpipettieren wurde das Gemisch zur Komplexbildung für 10 min bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch mit 500 µl OptiMEM versetzt und vorsichtig zu den Zellen gegeben. Die sich anschließende Inkubation dauerte drei Stunden und erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Danach wurden die Zellen im Mikroskop begutachtet, zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit dem für die Zelllinie spezifischen Medium ohne Zytostatikum versetzt. Einen Tag nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen und eine Kavität mit den untransfizierten Ausgangszellen, mit Selektionsmedium (Medium mit 400 µg/ml Zeocin) versetzt. Nach dem Absterben der unter Zeocin laufenden untransfizierten Ausgangszellen wurden die transfizierten Zellen auf 10 cm² Schalen expandiert. Herangewachsene Zellklone wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in einer 12-well Platte unter Zeocin-Einfluß weiterkultiviert.

2.2.2.4 Zytotoxizitätsassay mittels Sulforhodamin B (SRB)

Der Zytotoxizitätsassay basierend auf einer Färbung mittels Sulforhodamin B bietet eine Möglichkeit, behandelte und unbehandelte Zellen hinsichtlich ihrer Zellzahl zu vergleichen, da diese mit der angefärbten Proteinmenge korreliert (Skehan *et al.*, 1990, Perez *et al.*, 1993). Für den Zytotoxizitätsassay wurden die zu untersuchenden Zellen in 3 x 10 Kavitäten einer 96-well Mikrotiterplatten ausgesät. Sofort, nach 24 h bzw. 48 h wurde 100 µl zytostatikumhaltiges Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen für weitere 5 Tage

kultiviert. Danach wurde das Medium verworfen und die Zellen in 10 %iger Trichloressigsäure für 1 h bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend fünfmal mit Wasser gewaschen und die zellulären Proteine für 10 min mit SRB-Lösung gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde durch fünfmaliges Waschen mit 1 %iger Essigsäure entfernt und die Mikrotiterplatten getrocknet. Die Protein-SRB-Komplexe wurden dann mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. Die Farbeintensität konnte durch photometrische Messung im Plattenlesegerät EL-340 bei 562 nM gegen 690 nM (Referenzwellenlänge) bestimmt und gegen die unbehandelten Kontrollen (100 %) normalisiert werden.

Zelllinie

Zytostatika-Konzentrationen [nM]

EPP85-181P, EPG85-257P

4,43; 8,87; 17,73; 44,33; 88,65; 177,30; 886,50;
1773,00; 4432,60

EPP85-181RDB; EPG85-257RDB

8,87; 44,33; 88,65; 177,30; 886,50; 1773,00;

und ihre Transfektanten

8865,00; 17731,00; 44326,00

MaTu; MaTu/ADR;

1,72; 4,31; 8,62; 17,24; 43,10; 86,21; 172,41;

und ihre Transfektanten

431,03; 862,07

SRB-Lösung

Sulforhodamin B

0,4 % (w/v)

Essigsäure

1 % Essigsäure

2.2.3 *in vivo* Experimente

Die folgenden Versuche wurden von der Firma EPO (Frau Dr. Iduna Fichtner) sowie von Frau PD Dr. Ulrike Stein und Herrn PD Dr. Wolfgang Walther vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin durchgeführt.

2.2.3.1 Intratumorale (i.t.) *in vivo*-Injektion von anti-MDR1 shRNA-kodierenden

Plasmiden

Mäusen (NMRI:nu/nu) wurden subkutan 1×10^7 Zellen / Tier der chemoresistenten Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR bzw. der sensiblen MaTu transplantiert (6 Tiere pro Gruppe; EPO GmbH Berlin). Während des kompletten Experiments wurde das Tumorstadium überwacht. Die Behandlung wurde bei einem Tumordurchmesser von 6 mm am 19. Tag begonnen. Die intratumorale Jet-Injektion mit 4×10^6 µg / 10 µl des

shRNA MDR-C kodierenden Vektor oder des Ausgangsvektors psiRNA-hH1zeo (psiRNA-hH1), oder mit $4 \times 10 \mu\text{l}$ PBS, erfolgte an Tag 19. und Tag 27. Die intravenöse (i.v.) Behandlung mit Doxorubicin (Doxo) wurde zeitversetzt am 22. und 30. Tag durchgeführt. Die Mäuse wurden am 40. Tag getötet. Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon Signed Rank Test. Die folgenden Gruppen wurden untersucht:

- MaTu PBS i.t. + PBS i.v.
- MaTu PBS i.t. + Doxorubicin i.v.
- MaTu/ADR PBS i.t. + PBS i.v.
- MaTu/ADR PBS i.t. + Doxorubicin i.v.
- MaTu/ADR psiRNA-hH1 i.t. + PBS i.v.
- MaTu/ADR psiRNA-hH1 i.t. + Doxorubicin i.v.
- MaTu/ADR psiRNA-hH1 shRNA MDR-C i.t. + PBS i.v.
- MaTu/ADR psiRNA-hH1 shRNA MDR-C i.t. + Doxorubicin i.v.

2.2.3.2 RNA-Isolation aus Maustumoren und Quantifizierung der MDR1 Expression mittels *real-time* RT-PCR

Mäusen (NMRI:nu/nu) wurden subkutan 1×10^7 Zellen / Tier der chemoresistenten Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR transplantiert. Die Behandlung wurde bei einem Tumordurchmesser von 6 mm am 19. Tag begonnen. Die intratumorale Jet-Injektion mit $4 \times 10 \mu\text{g} / 10 \mu\text{l}$ des shRNA MDR-C kodierenden Vektors oder des Ausgangsvektors psiRNA-hH1zeo erfolgte am Tag 19. Die Tiere wurden ein, zwei bzw. drei Tage nach der Injektion getötet, der Tumor isoliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Konsekutive Kryoschnittserien wurde aus 4 Fraktionen eines Tumors hergestellt und die RNA mittels Trizol isoliert. Quantitative real-time RT-PCR für MDR1 und GAPDH erfolgte im LightCycler System (Stein *et al.*, 2002).

2.2.3.3 Immunhistochemie

Für die Analyse des Proteingehalts wurden konsekutive Kryoschnitte verwendet, die parallel zu den oben genannten angefertigt worden sind. Die luftgetrockneten Schnitte wurden mit Azeton fixiert, mit H_2O_2 behandelt und mit Serum geblockt. Die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper C219 (Merck) erfolgte für 2 h in einer Verdünnung von 1:10. Der mit HRP-gekoppelte Zweitantikörper (1:500; Perbio Science) verblieb für eine Stunde auf den Schnitten. Anschließend wurde der P-Glykoprotein-Komplex mit Diaminbenzidin detektiert. Danach erfolgte eine Gegenfärbung Hemalum.

2.2.4 Mikrobiologische Methoden

2.2.4.1 Transformation von Bakterien

2.2.4.1.1 *TOPO10 (Invitrogen)*

Zur Klonierung von PCR-Produkten in kompetente *E. coli* Bakterien wurde das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet.

Für die TOPO Cloning-Reaktion wurden 4 µl des PCR-Produktes eingesetzt, mit 1 µl Salzlösung und 1 µl pCR[®] 2.1-TOPO-Vektor versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Für die Transformationsreaktion wurden die chemisch kompetenten Bakterien (TOP10) mit 2 µl TOPO Cloning-Reaktionsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 sec bei 42 °C hitzegeschockt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen zur Ausbildung der Ampicillinresistenz bei 37 °C für 60 min geschüttelt. 50-100 µl der Bakterienzellsuspension wurden auf entsprechend vorgewärmten LB-Agar-Platten mit Carbenicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und analysiert.

LB-Medium

Bacto [®] Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Bacto [®] Trypton	1,0 % (w/v)
NaCl	0,6 % (w/v)
in ddH ₂ O	

SOC-Medium

Bacto [®] Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Bacto [®] Trypton	2 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM
in ddH ₂ O	

LB-Agar

LB-Medium

Bacto® Agar 1,5 % (w/v)

2.2.4.1.2 GT116 (InvivoGen)

Zur Konstruktion von shRNA-exprimierenden Vektoren wurde das Plasmid psiRNA-hH1zeo der Firma InvivoGen verwendet (Abbildung 4). Dieses Plasmid wurde speziell zur Expression kurzer synthetischer Oligonukleotide entwickelt und hat eine Größe von 2938 bp. Auf dem Vektor befinden sich bei 2565 bp und 2904 bp zwei *Bbs*I-Schnittstellen sowie zwei *Ase*I-Schnittstellen, die bei 2595 bp und 784 bp lokalisiert sind. Weiterhin enthält er ein *LacZ* Gen, welches eine spätere Unterscheidung möglicher positiver Bakterienklonen mittels Blau/Weiß-Selektion zuläßt. Die Zeocinresistenz wird dem Plasmid durch das *Sh ble* Gen von *Streptoalloteichus hindustanus* verliehen, welches für ein Protein kodiert, das an Zeocin bindet, wodurch es seine DNA-spaltende Aktivität verliert. Diese Kriterien sind für die spätere Selektion positiver Bakterien- bzw. Zellklonen von entscheidender Wichtigkeit.

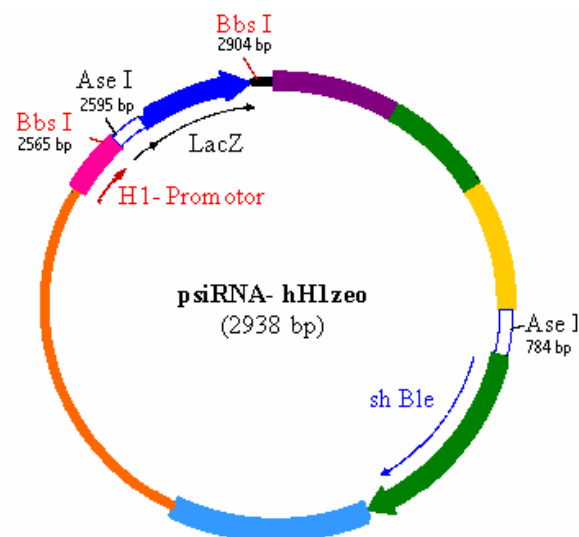


Abbildung 5: Vektorkarte von psiRNA-hH1zeo (www.invivogen.com)

Im ersten Schritt wurde der Vektor mittels *Bbs*I geschnitten (Kap. 2.2.5.2) und das entstandene 2640 bp große Vektorfragment über Gelextraktion isoliert (Kap. 2.2.5.5). Die Oligonukleotide wurden hybridisiert, indem je 2 µl der Oligonukleotide (25 µM) mit 6 µl 0,5 M NaCl und 20 µl ddH₂O gemischt und bei 80 °C für 2 min inkubiert wurden.

Ligationsansatz:

geschnittener Vektor	100 ng
hybridisierte Oligonukleotide	1 µl
T4 Polynukleotidkinase	1 U
10 x Ligationspuffer	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Der obige Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert.

Für die Transformationsreaktion wurden 100 µl kompetente GT116 Bakterien mit 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Ein 3 minütiger 42 °C heißer Hitzeschock machte die Bakterien aufnahmefähig für die Plasmide. Nach 10 min auf Eis wurden die Bakterien zur Resistenzausbildung mit 250 µl TY-Medium versetzt und eine Stunde im 37 °C Schüttler inkubiert. Im Anschluß wurden 150 µl Bakterienlösung auf vorgewärmte TY-Agarplatten mit 25 µg/ml Zeocin gebracht und über Nacht im 37 °C Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und analysiert.

TY-Medium

Bacto [®] Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Bacto [®] Trypton	2,0 % (w/v)
NaCl	0,6 % (w/v)
in ddH ₂ O	

TY-Agar

TY-Medium	1 ×
Bacto [®] Agar	1,5 % (w/v)
X-Gal	40 µg/ml
Zeocin	25 µg/ml

2.2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***2.2.4.2.1 Isolierung über das Qiagen Miniprep Kit**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus dem *Escherichia coli* Stamm GT116 bzw. aus dem *Escherichia coli* Stamm TOP10 erfolgte aus 37 °C Übernachtskulturen, die in 5 ml LB-Medium mit Zeocin (25 µg/ml) bzw. Carbenicillin (100 µg/ml) angezogen wurden.

Am nächsten Tag wurde 500 µl der Übernachtskultur mit 500 µl Glycerin versetzt und als

Glyzerindauerkultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde unter Zuhilfenahme des QIAprep Miniprep Kits von Qiagen entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.2.2 Isolierung mittels EndoFree Maxi Kit für die Injektion in NMRI:nu/nu Mäuse

Für die Präparation von Plasmid-DNA für den Einsatz im *in vivo*-Modell wurde das EndoFree Maxi Kit von Qiagen verwendet.

Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem *Escherichia coli* Stamm GT116 erfolgte aus einer $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Übernachtskultur, die in 500 ml TY-Medium mit $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ Zeocin angeimpft wurde. Nach der Anlage von Stammkulturen wurden die restlichen Bakterien bei $6000 \times g$ (Beckman, Rotor JLA 10.50) und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min pelletiert und in 20 ml mit RNaseA versetztem P1 Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 ml P2 Puffer und mehrmaligem Schwenken erfolgte eine 5 minütige Inkubationsphase bei RT. Nach der alkalischen Lyse wurden 20 ml P3 Puffer zu der Lösung hinzugegeben. Das Präzipitat, bestehend aus genomischer DNA, Proteinen, Zellmembranen und SDS, wurde zum größten Teil durch eine Zentrifugation (Beckman, Rotor JLA 10.50) bei 5000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min entfernt. Der Rest wurde unter Zuhilfenahme der QIAfilter Cartridges entfernt. In der Zwischenzeit wurde die Qiagen-tip 500 Säule mit 10 ml QBT Puffer äquilibriert. Danach wurde das geklärte Lysat auf die Säule gegeben. Der Bindung der DNA an die Säule folgte die Waschprozedur, die aus zweimaligem Waschen mit je 30 ml QC Puffer bestand. Danach wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF aus der Säule eluiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde $10,5\text{ ml}$ 2-Propanol zum Eluat gegeben, gut gemischt und bei 10000 rpm (Beckman, JA 20) und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und abermals bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet unter der Sterilbank getrocknet und in sterilem, molekularbiologischem Wasser gelöst.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte in einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der DNA bzw. RNA kann unter Berücksichtigung der Verdünnung aus der gemessenen OD berechnet werden. Es gilt: $1\text{ OD}_{260\text{nm}}$ entspricht $50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA bzw. $40\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ einzelsträngiger DNA oder RNA. Um die Reinheit der Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde zusätzlich die

optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 280 nm (Protein-Absorptionsmaximum) gemessen.

2.2.5.2 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers in 20 µl Ansätzen.

2.2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.5.3.1 PCR mit AmpliTaqGold™ DNA Polymerase

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerasekettenreaktion wurde die „hot start“ DNA-Polymerase AmpliTaqGold™ verwendet und der folgende Ansatz pipettiert:

AmpliTaqGold™	0,5 µl	1 U
Matrize (cDNA oder genomische DNA)	40-500 ng	
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl	200 µM
5'-Primer (5 µM)	1,0 µl	200 nM
3'-Primer (5 µM)	1,0 µl	200 nM
10 x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 x
ddH ₂ O	auf 25 µl	

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

1.	12 min	94 °C	Aktivierung des Enzyms
2.	30 sec	94 °C	Denaturierung der dsDNA
3.	30 sec	Tabelle 9	Hybridisierung der Primer
4.	60 sec	72 °C	Elongation der Primer durch die Polymerase
5.	10 min	72 °C	Extension
6.	∞	4 °C	Abkühlung

Die Schritte 2 bis 4 wurden je nach zu amplifizierendem Produkt 36- bzw. 45-mal durchlaufen.

Tabelle 9: Hybridisierungstemperaturen (T_H) der verwendeten Primer

5' und 3' Primer	T_H [°C]	PCR-Produkt-Länge	Verwendungszweck
Aldolase fwd/rev	56 °C	249 bp	Sonde für Northern Blot, Quantifizierung mittels <i>real-time</i> RT-PCR
MDR1 fwd/rev	58 °C	299 bp	Sonde für Northern Blot, Quantifizierung mittels <i>real-time</i> RT-PCR
OL381 fwd/rev	55 °C	397 / 686 bp	Insertkontrolle

2.2.5.3.2 Real time-RT-PCR im LightCycler

Die LightCycler-Technologie bietet die Möglichkeit, aufgrund einer mitlaufenden Standardreihe mittels mathematischer Methoden auf die Ausgangsmolekülzahl in einer Probe für eine bestimmte Matrice zu schließen. Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

ddH ₂ O	18 µl	
DNA Master SYBR Green I	2,0 µl	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	4 mM
5'-Primer (10 µM)	1,0 µl	500 nM
3'-Primer (10 µM)	1,0 µl	500 nM
cDNA	2,0 µl	

Es wurde bei jedem Lauf eine Nullkontrolle (ddH₂O) und eine Standardreihe bestehend aus 6 bis 8 Proben (10er Verdünnungsstufen) mitgeführt. Vor jeder Quantifizierung wurde der spezifische Meßpunkt der jeweiligen PCR anhand der Schmelzkurve eines Probelaufs bestimmt. Die Meßtemperatur ($T_{Meß}$) wurde so ausgewählt, daß sie knapp vor dem Abschmelzen des PCR-Produkts lag. Bei dieser Temperatur liegen eventuell vorhandene Primer-Dimere bereits als DNA-Einzelstränge vor und gehen somit nicht in das Meßergebnis mit ein.

2.2.5.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte durch das Qiagen QIAquick PCR Purification Kit. Die Aufreinigung wurde mit der Zugabe von 5 Volumenteilen Puffer PB zu 1 Volumenteil PCR-Produkt begonnen. Dieses Gemisch wurde auf eine vorbereitete Qiagen-Säule gegeben und zur Bindung der DNA an die Säulenpartikel 1 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses folgte ein Waschschriff mit 750 µl Puffer PE. Nach einer 2 × 1 minütigen Zentrifugation wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube gesteckt und die DNA mit 30 µl ddH₂O eluiert.

2.2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden horizontale Gelapparaturen (BioRad) verwendet. Die Gele wurden mit 1,0 % [w/v] Agarose in 1 × TAE Puffer gegossen und enthielten 0,2 µg/ml Ethidiumbromid. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit 1/10 Volumenanteil Blue/Orange 6 x Loading Dye versetzt. Als Größenstandards wurde je nach aufzutrennender DNA eine 100 bp- oder eine 1 kb DNA-Marker verwendet. Die Elektrophorese selbst erfolgte in 1 × TAE Puffer bei einer Spannung von 80-90 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

50 x TAE

EDTA	50 mM
Essigsäure	19 mM
Tris-Base	40 mM
pH 8,0	

2.2.5.6 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte unter Zuhilfenahme des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen). Zuerst wurde die zu eluierende Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Zu je 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer QG hinzugegeben und für 10 min unter Schütteln bei 50 °C bis zum vollständigen Lösen des Gelstücks inkubiert. Anschließend erfolgte die Beladung der vorbereiteten QIAquick Säule mit der Lösung und eine 1 minütige Zentrifugation. Die Säule wurde mit 500 µl Puffer QG

und 750 µl Puffer PE gewaschen, wobei die aufgefangene Flüssigkeit stets verworfen wurde. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte eine erneute Zentrifugation, um eine völlige Entfernung des mit Ethanol versetzten Puffers PE zu erreichen. Zur Elution der DNA wurden 30 µl Puffer EB auf die Säule gegeben und diese für 1 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mittels Zentrifugation eluiert.

2.2.5.7 Automatische Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch Herrn Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin.

Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt. Die Sequenzierung selbst erfolgte unter Verwendung eines ABI-373 DNA Sequenzierungsautomaten und des ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach der ursprünglichen Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Termination erfolgte durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide.

2.2.5.8 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolation von genomischer DNA mittels Wizard SV Genomic DNA Purification Kit wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert, trypsinisiert und in 1 x PBS gewaschen. Das daraus resultierende Zellpellet wurde in 500 µl Lysispuffer resuspendiert und anschließend auf eine Säule gebracht. Zur Bindung der DNA an die Matrix erfolgte eine 3 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule viermal mit dem alkoholhaltigen Waschpuffer gewaschen. Zum Trocknen der Säulenmatrix wurde diese nochmals für 2 min und 13000 rpm zentrifugiert. Die Elution der genomischen DNA erfolgte mit 250 µl nuklease-freiem Wasser. Zu dem Eluat wurden noch 2 µl RNase A hinzugegeben und die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.6 RNA-Techniken

2.2.6.1 RNA-Isolation mittels RNeasy mini Kit (Qiagen)

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden 70-80 % konfluente Zellen in einer 25 cm²-Flasche mit 1 × PBS gewaschen und trypsiniert. Das Trypsin-Zellysat wurde anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluß daran einmalig mit 1 × PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 350 µl RLT Puffer mit 2-β-Mercaptoethanol (10 µl je 1 ml RLT Puffer) resuspendiert. In diesem Zustand wurden die Zellen für mindestens einen Tag bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Zellsuspension erfolgte die Isolation der RNA gemäß Kit Protokoll. Gelagert wurde die RNA bei -80 °C

2.2.6.2 Northern Blot Analyse

2.2.6.2.1 Auftrennung von RNA

Zur Auftrennung von RNA wurde ein 1 %iges Agarosegel mit 1 x MOPS-Puffer und 6 % Formaldehyd gegossen. MOPS und Formaldehyd wurden erst nach dem Erhitzen und Abkühlen des Gemisches auf ca. 60 °C hinzugefügt.

5-10 µg RNA wurden mit RNA-Ladepuffer (NorthernMax von Ambion) auf ein Volumen von 20 µl gebracht, bei 65 °C für 10 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Die Auftrennung der RNA in 1 x MOPS-Puffer erfolgte bei einer Spannung von 80 V, bis die Bromphenolblau-Bande ca. ¾ der Wegstrecke durchlaufen hatte.

25 x MOPS-Puffer

MOPS	5 M
Natriumazetat	12,5 M
EDTA	0,25 M
in ddH ₂ O	
pH 7,0	

2.2.6.2.2 *Transfer*

Die Northern Blot Analyse wird zum Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen in Gesamt-RNA angewendet. Dafür wurde 5-10 µg Gesamt-RNA wie oben beschrieben (Kap. 2.2.6.2.1) im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter dem UV-Transilluminator die Integrität der RNA kontrolliert. Vor dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde das Gel zweimal 10 min in ddH₂O gespült, um den Formaldehyd zu entfernen. Weiterhin erfolgte ein 30 minütiger Waschschrift mit 10 × SSC. Der Transfer erfolgte mittels „Reverse Kapillarblotting“ (Zhou *et al.*, 1994). Zu diesem Zweck wurden auf eine 10 cm hohe Zellosoeschicht zwei gelgroße, in 10 × SSC getränkte Whatman-Papierstreifen gelegt. Darauf wurden die Nylon-Membran und das RNA-Gel geschichtet. Die Randbereiche wurden durch eine Folie abgedeckt, um Kurzschlüsse zu vermeiden. Es folgten zwei angefeuchtete Whatman-Papiere sowie ein in 10 × SSC getränkter Schwamm.

Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach dem Abbau wurden der Größenstandard und die ribosomalen Banden auf der Membran markiert. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte für 3 min bei 120000 mJ/cm² im UV-Crosslinker.

20 x SSC

NaCl	3,0 M
Na ₃ -Citrat	0,3 M
in ddH ₂ O	
pH 7,0	

2.2.6.2.3 *Radioaktive Sondenmarkierung*

Als Sonden für die radioaktive Hybridisierung wurden mittels MegaprimeTM DNA Labelling System markierte PCR-Produkte verwendet. Zu diesem Zweck wurden 25 ng PCR-Produkt in einem Endvolumen von 28 µl mit DEPC-H₂O verdünnt, nach der Zugabe von 5 µl Random-Primern bei 95 °C für 5 min denaturiert und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurden 10 µl Labelling Puffer, 2 µl Klenow-Fragment (1 U/µl) und 5 µl ³²P-dCTP hinzugefügt. Die Amplifikation des komplementären Stranges erfolgte für 30 min bei 37 °C unter Einbau von radioaktiv markiertem dCTP. Die Denaturierung der Sonde erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C. Danach wurde die Sonde auf Eis gestellt, um eine erneute Zusammenlagerung der Einzelstränge zu verhindern.

2.2.6.2.4 Hybridisierung

Für die radioaktive Hybridisierung wurde die ExpressHyb™ Hybridisierungslösung verwendet. Die Prähybridisierung der Membran (Kap. 2.2.6.2.2) erfolgte bei 58 °C für ca. 30 min. Für die Hybridisierung, die bei 58 °C über Nacht erfolgte, wurde die denaturierte Sonde hinzugefügt. Am nächsten Tag wurden die Blots zweimal 30 min bei 31 °C mit Waschpuffer 1 und zweimal 30 min bei 55 °C mit Waschpuffer 2 gewaschen. Schließlich folgte die Exposition von BIOMAX MR-Filmen durch die eingeschweißten Membranen bei -80 °C.

Zur Entfernung der Sonde vom Blot wurde eine 0,5 %ige SDS-Lösung hergestellt und aufgekocht. Die entsprechenden Membranen wurden in die heiße Lösung gegeben und für 30 bis 60 min in der sich abkühlenden Flüssigkeit belassen.

Waschpuffer 1

SSC (siehe Kap. 2.2.6.2.2)	2 x
SDS	0,1 %
in ddH ₂ O	

Waschpuffer 2

SSC (siehe Kap. 2.2.6.2.2)	0,1 x
SDS	0,1 %
in ddH ₂ O	

2.2.6.3 Expressionsnachweis

Nach der Transfektion der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR mit dem shRNA MDR-C kodierenden Vektor erfolgte der Nachweis der innerhalb der Tumorzellen durch den *Dicer* prozessierten siRNA-Moleküle in folgenden Schritten:

2.2.6.3.1 Isolierung von miRNA

Die Isolierung von kleinen RNAs (*mirVana*™ miRNA Isolation Kit; Ambion) erfolgte aus T25-Flaschen. Die Zellen wurden bei 70 % Konfluenz trypsiniert, in 1 x PBS gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 150 µl *RNAlater*® aufgenommen und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension abermals pelletiert und nach den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.6.3.2 Auftrennung

Der Nachweis von prozessierten siRNAs erfolgte nach einem modifizierten Protokoll für die Northern Blot Analyse. Zur Auftrennung der angereicherten miRNA (2.2.6.3.1) bei 250 V wurden 2 µg miRNA in RNA-Ladepuffer bei 65 °C für 10 min denaturiert, anschließend auf Eis inkubiert und auf ein 15 %iges denaturierendes Acrylamid-Gel (siehe unten) in eine vertikalen Apparatur in 1 × TBE-Puffer aufgetragen.

15 %iges Trenngel

Acrylamid-Bis-Acrylamid	10 ml
(19:1)	
10 % APS	400 µl
Harnstoff	21 g
1 x TBE	5 ml
TEMED	40 µl
ddH ₂ O	

1 x TBE

Borsäure	90 mM
EDTA	2 mM
Tris-Base	90 mM

Vor dem Transfer der miRNA auf eine Nylonmembran wurde das Gel einmal für 10 min in 10 x SSC inkubiert und mittels reverser Kapillarmethode über 24 h transferiert und UV-fixiert.

2.2.6.3.3 Radioaktive Hybridisierung

Als Sonden wurden 10 pmol der *antisense* DNA-Oligonukleotide (Tabelle 6) mittels T4 Polynukleotidkinase und ³²P-dATP nach Angaben des Herstellers endmarkiert.

Die Prähybridisierung der auf die Nylonmembran fixierten miRNA erfolgte bei 65 °C in einer Prähybridisierungslösung (6x SSC, 10x Denhardt's Reagenz, 0,2 % SDS) für 1 h. Die eigentliche Hybridisierung der miRNA in 0,1x SSC, 5x Denhardt's Reagenz und 0,2 % SDS mit 10 pmol radioaktiv markierter *antisense* DNA erfolgte für 16 h unter ständiger Rotation bei Raumtemperatur. Am Folgetag wurden die Membranen 2x 30 min bei RT mit einer Lösung bestehend aus 6x SSC und 0,2 % SDS gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde

zu entfernen. Die Exposition der hybridisierten Membranen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fand in Expositionskassetten mit Verstärkerfolien statt.

2.2.6.4 Reverse Transkription

2 μg Gesamt-RNA (Kap. 3.5.1) wurde unter Verwendung des SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

2.2.7 Proteintechniken

2.2.7.1 Isolierung von Gesamtproteinen

Eukaryotische Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80 % isoliert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Die Schalen wurden auf Eis gestellt, jeweils mit 200 μl Ripapuffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde die Zell-Puffer-Suspension 15 min bei 14000 rpm (Beckmann) und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:3 mit 4 x Probenpuffer versetzt. Daraufhin wurde die Proteinlösung für 10 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert und anschließend für 5 min bei 14000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4 x Proben-Puffer

Tris-HCl, pH 6,8	160 mM
DTT	100 mM
SDS	10 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
Bromphenolblau	Krümel

Ripapuffer

EGTA	5 mM
NaCl	150 mM
Tris-Base	50 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
Complete (Proteinaseinhibitor)	$\frac{1}{4}$ Tablette

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

In 2 ml Reaktionsgefäßen wurde je 1 ml Elutionslösung für die Proteinfärbung vorgelegt. Auf eine Nitrozellulosemembran wurde nebeneinander je 1 µl der zu bestimmenden Proteinlösungen pipettiert (Doppelbestimmung). Desweiteren wurde eine Standardreihe, ebenfalls als Doppelbestimmung, bestehend aus einer aufsteigenden Konzentrationsreihe aus in 1 × PBS gelöstem BSA mitgeführt. Die Membran wurde nach dem Antrocknen der Proben für 1 min in Amidoschwarzlösung angefärbt. Nach dem Verwerfen der Färbelösung wurde die Membran in der Entfärbelösung solange geschwenkt, bis der Membranhintergrund wieder seine ursprüngliche weiße Farbe angenommen hatte. Die blau gefärbten Proteinpunkte wurden im nächsten Schritt mit dem Skalpell quadratisch ausgeschnitten und in die mit Elutionslösung gefüllten Reaktionsgefäße überführt. Für den Referenzwert wurde ein quadratisches Stück gleicher Größe aus der entfärbten Membran geschnitten. Die Reaktionsgefäße wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt, wodurch das Amidoschwarz von der Membran gelöst wurde und die Elutionslösung sich blau färbte. Die gefärbten Lösungen wurden im Anschluß in Einmal-Küvetten unter Nutzung des Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 630 nm vermessen. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration der Proben anhand ihrer Extinktionswerten abgeleitet werden.

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	45 % (v/v)
in ddH ₂ O	

Elutionslösung

Ethanol	50 % (v/v)
0,5 M EDTA, pH 8,0	500 µM
0,5 M NaOH	25 mM
in ddH ₂ O	

Entfärbelösung

Essigsäure	45 % (v/v)
Methanol	1 % (v/v)
in ddH ₂ O	

2.2.7.3 Western Blot Analyse

2.2.7.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

10 mg Gesamtproteine wurden in 2 x Proben-Puffer auf 20 µl verdünnt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970) erfolgte in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur in 1 x Laufpuffer zunächst für 30 min bei 63 V, danach bei 95 V bis die Bromphenolbande aus der Gelapparatur gelaufen war.

7,5 %iges Trenngel

Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	3,75 ml
10 % APS	150 µl
ddH ₂ O	8,4 ml
10 % SDS	200 µl
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 ml
TEMED	15 µl

Zur Bildung einer ebenen Gelkante während der Polymersation wurde das Trenngel mit 2-Propanol überschichtet.

4,0 %iges Sammelgel

Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	1,0 ml
10 % APS	75 µl
ddH ₂ O	6,4 ml
10 % SDS	100 µl
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
TEMED	15 µl

10 x Laufpuffer

Glyzin	144 g
SDS	10 g
Tris-Base	30 g
ddH ₂ O	auf 1 Liter

2.2.7.3.2 Transfer (semi-dry)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtproteine wurde das Sammelgel abgetrennt. Trenngel, Zellulosenitrat-Membran und 2 Lagen Papier wurden in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einer *semi-dry* Blotapparatur (Bio-Rad) bei 12 V für 60 min, wobei die Anordnung des Papiers, der Membran und des Gels nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt wurde.

1 x Transferpuffer

Glyzin	150 mM
Methanol	20 %
Tris-Base	25 mM

2.2.7.3.3 Antikörper-Reaktion und Detektion mittels Chemolumineszenz

Die geblottete Membran wurde nach dem Transfer in eine Photoschale überführt und nacheinander mit den in der Tabelle 10 angegebenen Lösungen versetzt. Diese Schritte wurden bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken durchgeführt.

Tabelle 10: Auflistung der für den Western Blot eingesetzten Lösungen und die Dauer ihrer Anwendung

Anwendungsdauer	Substanzen/Lösungen
1 min	0,2 % [w/v] Ponceau-S in 1 % [v/v] Essigsäure
5 min	ddH ₂ O
2 h oder ün	Blockingpuffer (5 % [w/v] Milchpulver, 1 × TBST)
2 h oder ün	primärer Antikörper
	Antikörperverschüttung: C219 1:100, x-Actin 1:5 000 in 1 % [w/v] Milchpulver in 1 × TBST
4 × 7 min	Waschen in 1 × TBST
1 h	sekundärer Antikörper in 1 × TBS 1:10 000 verdünnt
4 × 10 min	Waschen in 1 × TBST
2 × 5 min	Waschen in 1 × TBS

Die Detektion erfolgte mittels SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate nach den Angaben des Herstellers. Die Exposition der Blots erfolgte auf Hyperfilm ECL.

Für eine erneute Antikörperinkubation eines Blots wurden die gebunden Antikörper mittels Western Blot Recycling Kit nach den Angaben des Herstellers entfernt und die Blots wie oben beschrieben weiterbehandelt.

1 x TBST

NaCl	150 mM
Tris-Base	7 mM
Tris-HCl	43 mM
Tween® 20	0,05 % (v/v)
pH 7,4–7,6	

2.2.7.4 Immunzytochemischer Nachweis von P-Glykoprotein

Der immunzytochemische Nachweis von P-Glykoprotein erfolgte durch Dr. Pawel Surowiak. Zur Detektion von P-Glykoprotein (MDR1) in den einzelnen Zelllinien wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät und bis zum Erreichen von 70 %iger Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Objektträger in 1 × PBS gewaschen, die darauf befindlichen Zellen mit einer Methanol-Azeton-Lösung (1:1) für 10 min bei RT fixiert und im Anschluß luftgetrocknet. Danach wurden die Objektträger für 5 min in einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Die immunzytochemische Reaktion wurde im Anschluß für 18 h bei 5 °C mit dem mouse mAb C219 (1:100) durchgeführt. Der Antikörper wurde in Antibody Diluent Background Reducing Lösung verdünnt. Parallel wurde zu jeder Reaktion eine Negativkontrolle angesetzt, die mit Primary Mouse Negative Control durchgeführt wurde. Die Antigene wurden mit Hilfe biotinylierter Antikörper (15 min bei RT), Streptavidin-Peroxidase-Komplex (15 min bei RT), LSAB+, HRP und NovaRed (10 min bei RT) sichtbar gemacht. Danach erfolgte eine Gegenfärbung und Dehydrierung der Präparate mit Mayer's Hematoxylin die daraufhin im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden konnten

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die RNA-Interferenz Technologie aufgegriffen werden, um den **Resistenz-assoziierten Faktor MDR1 zu inhibieren** und ein **Resensitivierung** der Zellen zu erreichen. Dabei wurde in verschiedenen humanen Zellmodellen (*in vitro*) sowohl die Gensuppression mittels siRNA transient erzeugt als auch über die Expression von shRNAs in einem stabilen Ansatz. Die intratumorale Applikation eines shRNA-kodierenden Vektors mittels Jet-Injektion sollte anschließend klärend, inwieweit im Tumormodell der Maus (*in vivo*) die MDR1 Überexpression durch die Induktion der RNA-Interferenz aufgehoben werden kann.

Für die folgenden Untersuchungen wurden in unserem Labor etablierte und gut untersuchte Zellmodelle, bestehend aus einer sensiblen und einer multidrug-resistenten Sublinie, herangezogen. Die Wahl fiel dabei auf drei MDR1-überexprimierende Tumorzelllinienpaare, die aus differenten epithelialen Geweben, wie Pankreas (EPP85-181), Magen (EPG85-257) und Mamma (MaTu), etabliert worden sind.

3.1 Posttranskriptionelle Genregulation durch exogene siRNAs

3.1.1 Auswahl der Zielsequenzen

Für die Applikation von synthetischen siRNAs wurden zwei Duplexe mit Homologie zur MDR1 mRNA Konsensus-Sequenz konstruiert. Die siRNAs wurden zum einen nach den Literaturempfehlungen entwickelt (siRNA MDR-A), zum anderen, aufbauend auf den Erfahrungen mit der Ribozym-Technologie (siRNA MDR-B; gegen MDR1 Ribozymschnittstelle), hinsichtlich der Sekundärstruktur und damit der Zugänglichkeit der homologen Sequenz (Elbashir *et al.* 2001; Holm *et al.* 1994). Beide Zielsequenzen wurden weiterhin nach dem Muster AA(N19) ausgewählt und hatten einen GC-Gehalt von 33 % bis 38 %. Als Kontrollen dienten die Einzelstränge der siRNAs sowie für die Versuche in der Mammakarzinomzelllinie eine anti-Luciferase (*firefly*) siRNA, die keine mRNA in der Zelle erkennt. In der Tabelle 11 sind die Zielsequenzen und deren Position in der MDR1 mRNA aufgelistet.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten siRNAs

Duplex	Zielsequenz 5' - 3'	Position auf der MDR mRNA ¹
siRNA MDR-A ²	AAG AAG GAA AAG AAA CCA ACU	nt 503 - 523
siRNA MDR-B ²	AAA AUG UUG UCU GGA CAA GCA	nt 3050 - 3070
	(gegen Ribozymschnittstelle)	

¹ Referenzsequenz NM_000927.2; ² Nieth *et al.*, 2003

3.1.2 siRNA-abhängige Inhibition der MDR1 mRNA-Expression und Proteinsynthese

3.1.2.1 Qualitative Analyse mittels Northern und Western Blot

Die Applikation der beiden siRNA Duplexe führte in allen drei untersuchten Tumorzelllinien zu einer zeitabhängigen Inhibition der MDR1 mRNA-Expression. Bei der vergleichenden Betrachtung der Zellmodelle zeigten sich Unterschiede sowohl in der Ausprägung als auch in der Dauer des RNA-Interferenz-abhängigen Effekts.

Die Untersuchungen der MDR1 mRNA-Expression zeigten in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB für beide siRNAs ein ähnliches Bild. So konnte sowohl am ersten als auch am dritten Tag nach der Transfektion im Northern Blot keine MDR1-spezifische mRNA mehr nachgewiesen werden. Am fünften Tag begann der Anstieg der Expression, wobei am zehnten Tag das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde (Abbildung 6 A und 6 C). Da das Protein die funktionelle Einheit bei der Resistenzausbildung darstellt, wurde im Folgenden der Gehalt an P-Glykoprotein in den Zellen bestimmt. Die maximale Reduktion der Proteinmenge zeigte sich an den Tagen drei und fünf (Abbildung 6 B und 6 D). Die zur Kontrolle der Resultate parallel durchgeführten Transfektionen mit den einzelsträngigen siRNAs ergaben nur für den *antisense*-Strang der siRNA MDR-B eine biologische Aktivität. Sowohl die mRNA- als auch die Proteinmenge war in diesen Zellen leicht reduziert (Abbildung 6 E und 6 F).

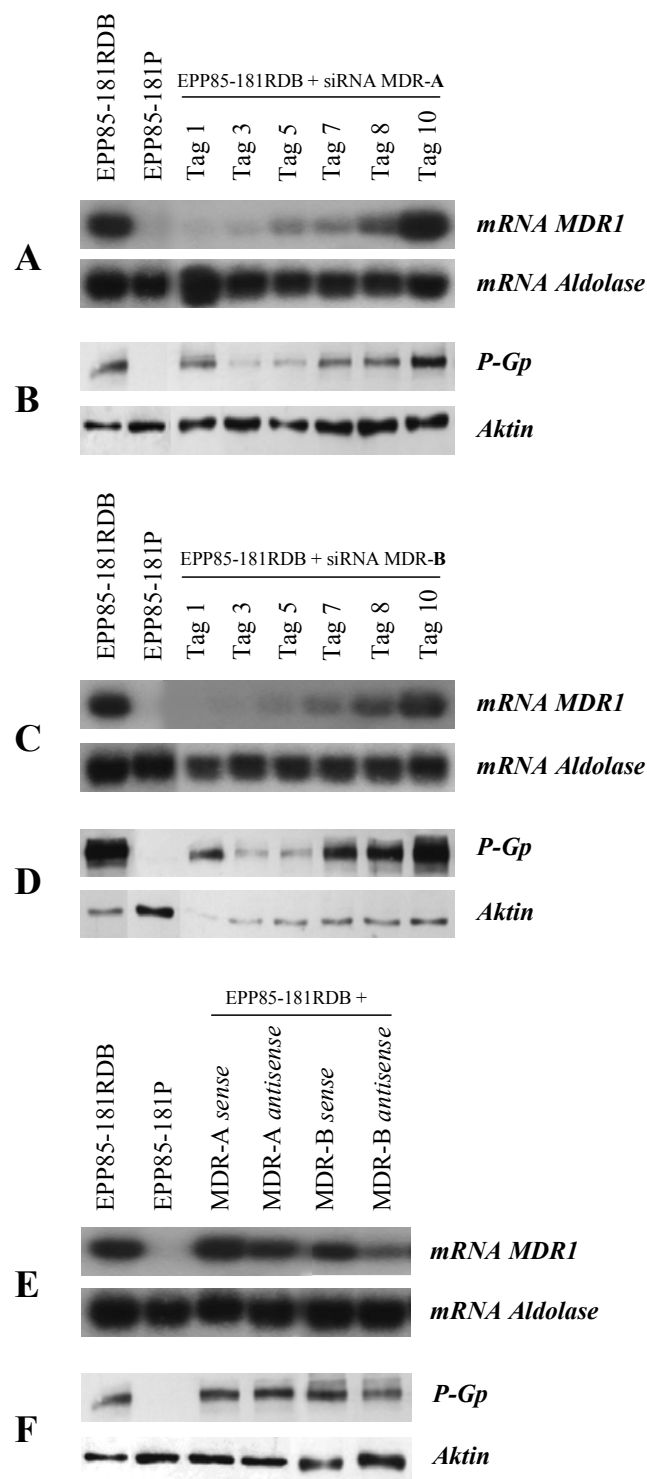


Abbildung 6: Charakterisierung der siRNA-abhängigen Erniedrigung des MDR1 mRNA und P-Glykoprotein Niveaus in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB

(A) Northern Blot Analyse zum Nachweis der MDR1 mRNA Inhibierung durch exogene siRNA MDR-A. (B) Nachweis von P-Glykoprotein (P-Gp) in den siRNA MDR-A transfizierten EPP85-181RDB. (C) MDR1 mRNA-Expression nach Transfektion mit der siRNA MDR-B. (D) siRNA MDR-B abhängige Erniedrigung des MDR1 Proteinniveaus (P-Gp). (E) Northern Blot und (F) Western Blot Analyse zwei Tage nach Transfektion mit den einzelsträngigen siRNAs (nach Nieth *et al.*, 2003)

In der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB konnte am 3. und 5. Tag für beide siRNA Duplexe eine starke Verminderung der MDR1 mRNA-Expression detektiert werden. Am fünften Tag stieg die Expression wieder an und lag am siebten Tag im Bereich der Ausgangszelllinie (Abbildung 7 A und 7 C). Die Western Blot Experimente zum Nachweis des transmembranständigen Transporters ergaben eine deutliche Reduktion der Proteinmenge durch beide siRNA Duplexe. Die Wirkung war zwischen dem dritten und siebten Tag am stärksten und stagnierte danach (Abbildung 7 B und 7 D). Die zur Kontrolle transfizierten Einzelstränge beeinflussten bis auf den *antisense*-Strang der siRNA MDR-**B** weder die Expression der MDR1 mRNA noch die Proteinmenge (Abbildung 7 E und 7 F).

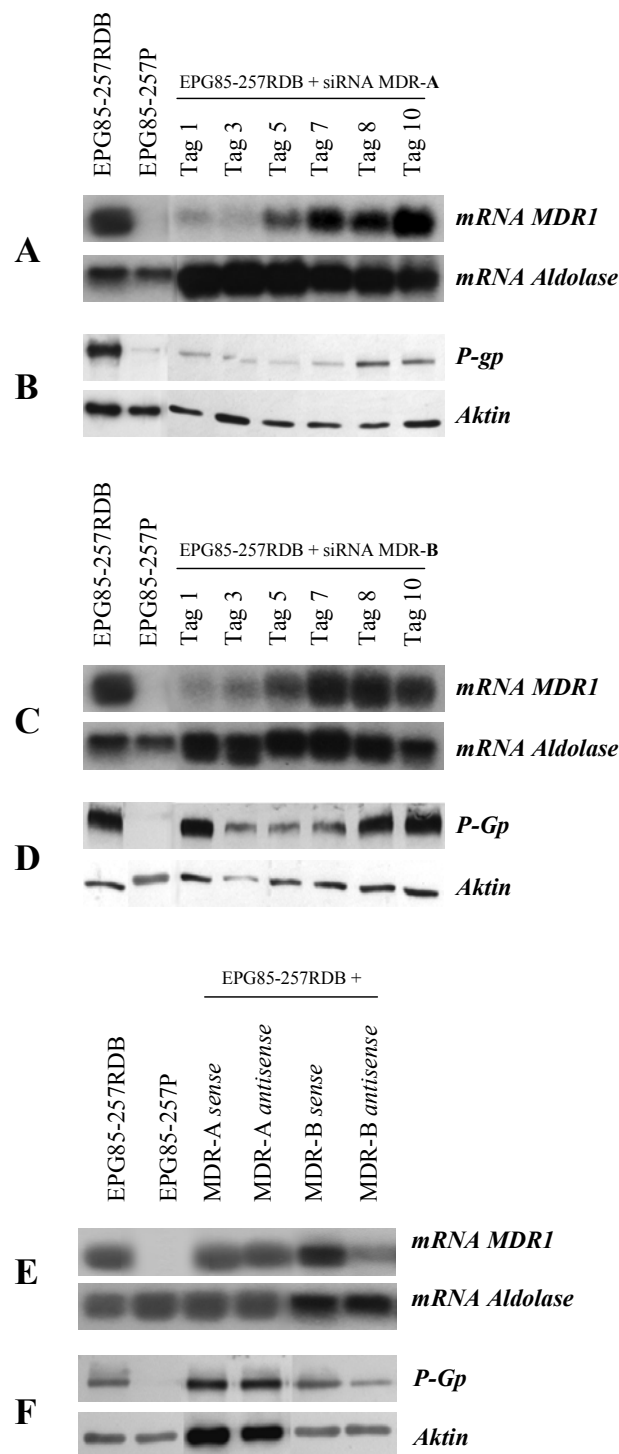


Abbildung 7: Charakterisierung der siRNA-abhängigen Erniedrigung des MDR1 mRNA und P-Glykoprotein Niveaus in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB

(A) Northern Blot Analyse zum Nachweis der MDR1 mRNA Inhibierung durch exogene siRNA MDR-A. (B) Nachweis von P-Glykoprotein (P-Gp) in den siRNA MDR-A transfizierten EPG85-257RDB. (C) MDR1 mRNA-Expression nach Transfektion mit der siRNA MDR-B. (D) siRNA MDR-B abhängige Erniedrigung des MDR1 Proteinniveaus (P-Gp). (E) Northern Blot und (F) Western Blot Analyse zwei Tage nach Transfektion mit den einzelsträngigen siRNAs (nach Nieth *et al.*, 2003).

Die Applikation der synthetischen siRNA MDR-A hatte in der resistenten Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR eine Senkung des MDR1 mRNA Niveaus zur Folge, die am ersten Tag ihr Maximum mit einer vollständigen Inhibition der mRNA-Expression erfährt und nach sieben Tagen endet (Abbildung 8 A). Auf Proteinebene waren die Effekte am ersten Tag eher gering ausgeprägt, während am dritten Tag eine starke Erniedrigung des Proteinniveaus zu sehen war. Am fünften Tag erreichte die Proteinmenge wieder das Ausgangsniveau (Abbildung 8 B).

Die siRNA MDR-B beeinflusste die MDR1 mRNA-Expression wesentlich stärker, so war eine vollständige Inhibition über drei Tage sichtbar. Das Ausgangsniveau wurde ebenfalls am siebten Tag wieder erreicht (Abbildung 8 C). Die Proteinmenge war bereits einen Tag nach Transfektion vermindert, die Repression am dritten bzw. fünften Tag am höchsten. Am siebten Tag wurde das Niveau der resistenten Ausgangszelllinien wieder erreicht (Abbildung 8 D).

Im Vergleich dazu hatten die verwendeten Kontrollen, bestehend aus den *sense*- bzw. *antisense*-Strängen sowie der Luciferase siRNA, nur geringe Wirkung auf die Expression der MDR1 mRNA und die Translation des Proteins (Abbildung 8 E und 8 F).

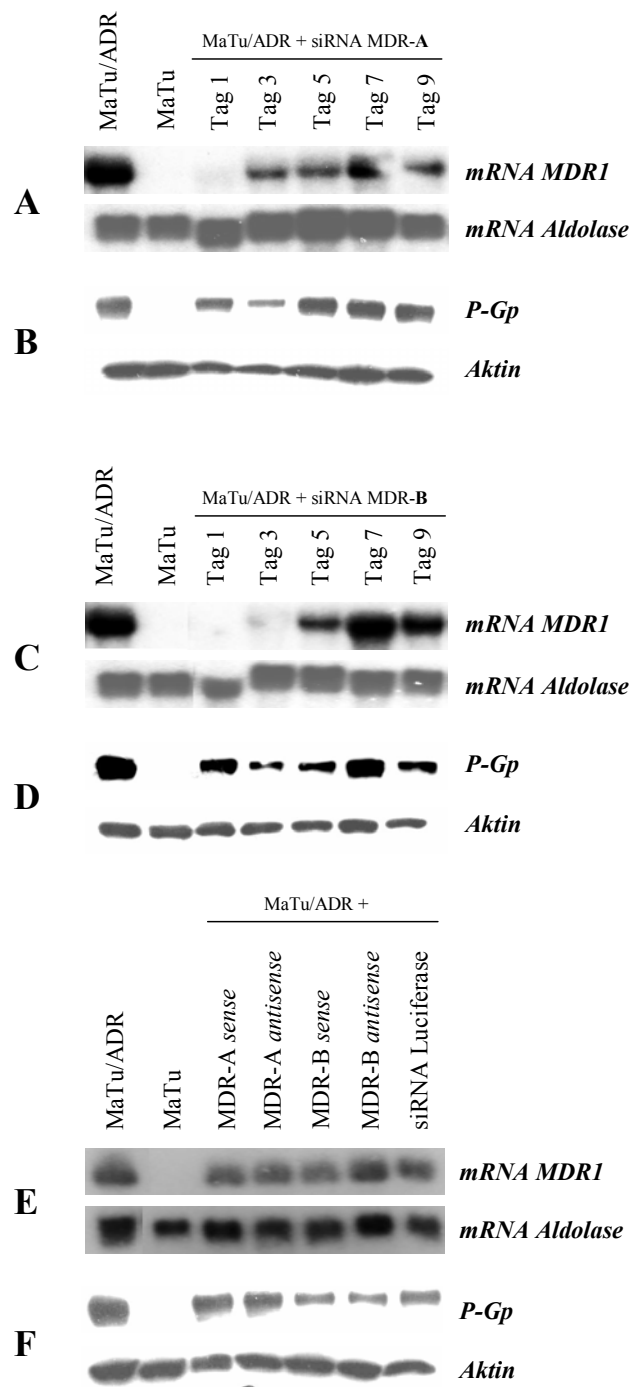


Abbildung 8: Charakterisierung der siRNA-abhängigen Erniedrigung des MDR1 mRNA und P-Glykoprotein Niveaus in der Mammarkarzinomzelllinie MaTu/ADR.

(A) Northern Blot Analyse zum Nachweis der MDR1 mRNA Inhibierung durch exogene siRNA MDR-A. (B) Nachweis von P-Glykoprotein (P-Gp) in den siRNA MDR-A transfizierten MaTu/ADR. (C) MDR1 mRNA-Expression nach Transfektion mit der siRNA MDR-B. (D) siRNA MDR-B abhängige Erniedrigung des MDR1 Proteinniveaus (P-Gp). (E) Northern Blot und (F) Western Blot Analyse zwei Tage nach Transfektion mit den einzelsträngigen siRNAs bzw. der siRNA gegen Luciferase.

3.1.2.2 Quantitative Analyse der MDR1 mRNA-Expression

Die siRNA vermittelte Degradation der MDR1 mRNA wurde durch eine weitere Methode validiert. Dazu wurden mRNA Proben aus einem Zeitversuch in cDNA umgeschrieben und mittels *real-time* PCR quantifiziert.

Für die Gastrointestinalentumorzelllinien (EPP85-181 und EPG85-257) wurden die zu quantifizierenden Proben zwei Tage nach der Transfektion geerntet. Bei der später hinzugekommenen Mammakarzinomzelllinie wurden zusätzlich für beide siRNAs den Northern Blots entsprechende Zeitreihen quantifiziert, um die zeitabhängige Inhibition der MDR1 mRNA-Expression besser untersuchen zu können. Die Kontrollen bestehend aus den Einzelsträngen der siRNAs und der anti-Luciferase siRNA wurden am zwei Tage quantifiziert.

Wie der Abbildung 9 A zu entnehmen ist, liegt die MDR1 mRNA-Überexpression in der multidrug-resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB 1088-fach im Vergleich zur sensitiven. Die Behandlung mit der siRNA MDR-A führte zu einer deutlichen Reduktion der Ziel-mRNA um 87 %. Im Vergleich zwischen den unbehandelten Zellen und den siRNA MDR-B transfizierten Zellen ergab sich eine Differenz der quantifizierten MDR1 mRNA-Menge von 91 %. Beide Einzelstränge der siRNA MDR-A führten zu geringen Veränderungen in der MDR1 mRNA-Expressionsstärke, im Einzelnen kam es zu einer Senkung auf 61 % (MDR-A *sense*) bzw. 62 % (MDR-A *antisense*). Die ebenfalls zur Kontrolle verwendeten Einzelstränge der zweiten siRNA (siRNA MDR-B) zeigten kein einheitliches Bild. Während der *sense*-Strang nur geringe Effekte zeigte, erniedrigte der *antisense*-Strang die Expression deutlich auf 30 % des Ausgangswertes.

Die MDR1 mRNA-Quantifizierung ergab für die resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB eine 933-fache Überexpression im Verhältnis zur sensiblen Ausgangszelllinie. Nur noch 13 % der ursprünglichen MDR1 mRNA konnte nach der Transfektion mit der siRNA MDR-A detektiert werden. Auf 26 % des Ausgangsniveaus konnte die MDR1 mRNA durch die Applikation der siRNA MDR-B vermindert werden. Damit beträgt die Genrepressionsaktivität der siRNAs 87 % bzw. 74 %. Für die Kontrollen konnte nur bei dem *sense*- und *antisense*-Strang der siRNA MDR-B eine deutliche Senkung der MDR1 mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 9 B).

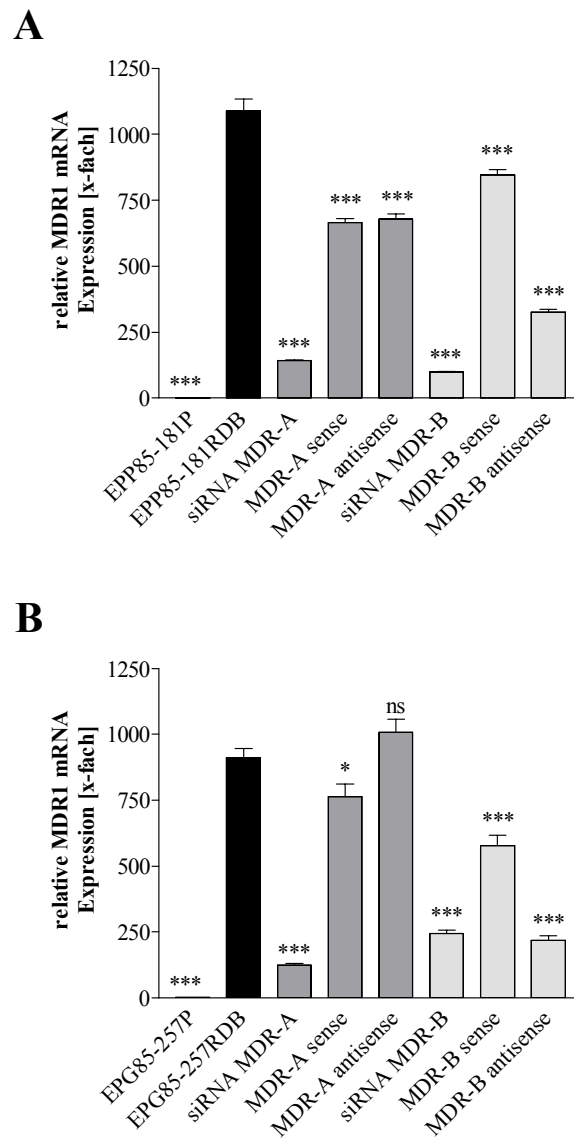


Abbildung 9: Quantifizierung der siRNA-abhängigen MDR1 mRNA-Repression

Dargestellt ist die relative MDR1 mRNA-Expression normalisiert auf die Aldolase mRNA-Expression. Die MDR1/Aldolase Ratio der sensitiven Zelllinie wurde jeweils eins gesetzt. **(A)** MDR1 mRNA-Expression in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB **(B)** Quantifizierung der MDR1 mRNA in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB (ns= nicht signifikant; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ (nach Nieth *et al.*, 2003)).

Die klassische multidrug-resistente Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR weist im Vergleich zur sensitiven (MaTu) eine 301-fache Überexpression der MDR1 mRNA auf. Durch die Transfektion mit der siRNA MDR-**A** konnte die Überexpression am fünften Tag auf nur noch 106-fach gesenkt werden. Dies entspricht einer Erniedrigung um 65 % auf nur noch 35 % der ursprünglichen Genexpression (Abbildung 10 A). Die maximale Inhibition durch die siRNA MDR-**B** konnte bereits am ersten Tag mit einer Absenkung auf 23 % des Ausgangsniveaus erreicht werden (Abbildung 10 B). Die Kontrollen, die am zweiten Tag nach der Transfektion isoliert worden sind, zeigten kein einheitliches Bild. So war die MDR1 mRNA-Expression in den mit den beiden MDR-**B** Einzelsträngen und der mit der anti-Luciferase siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu der Ausgangszelllinie fast unverändert. Die Behandlung mit den Einzelsträngen der siRNA MDR-**A** führte zu einer Erniedrigung der Expression. Für den *sense*-Strang bedeutet dies eine Repression auf 45 % und für den *antisense*-Strang auf 57 % des ursprünglichen mRNA Niveaus (Abbildung 10 C).

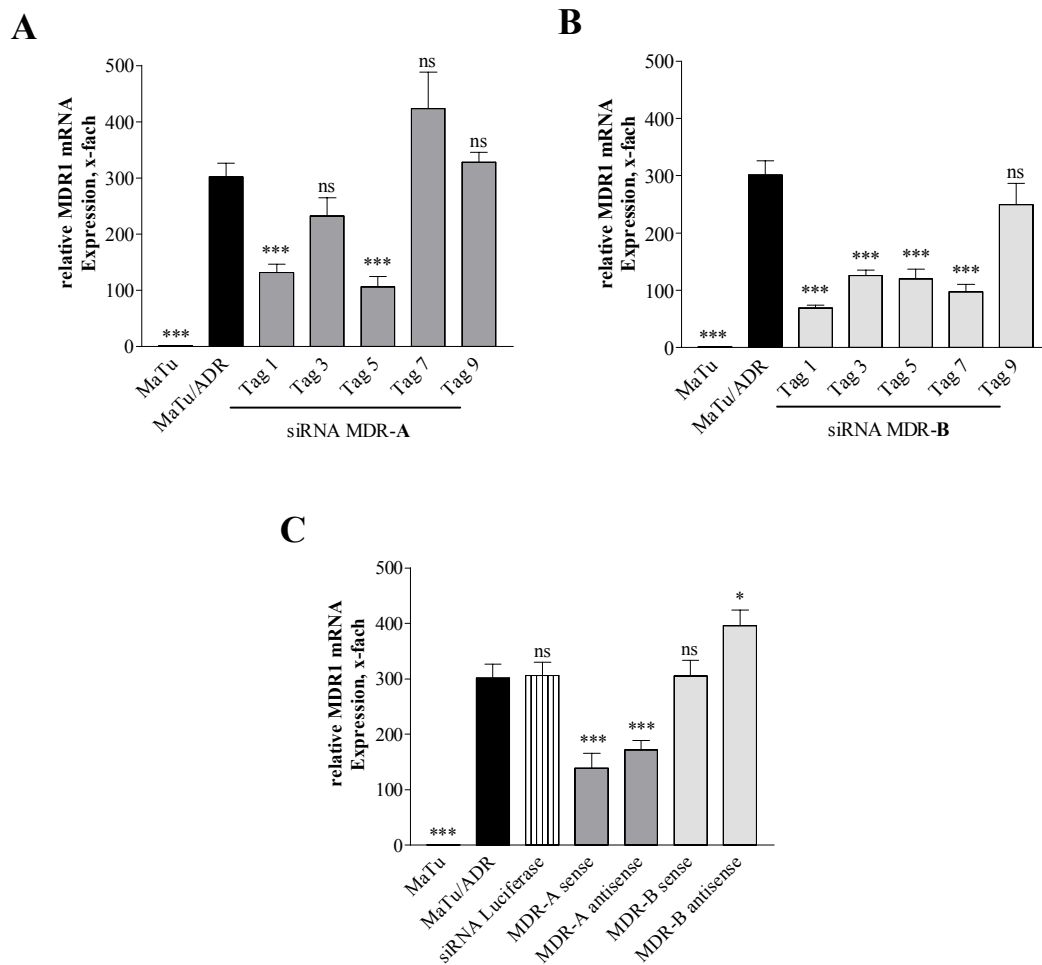


Abbildung 10: Quantifizierung der siRNA-abhängigen MDR1 mRNA-Repression

Dargestellt ist die relative MDR1 mRNA-Expression normalisiert auf die Aldolase mRNA-Expression. Die MDR1/Aldolase Ratio der sensitiven Mammakarzinomzelllinie wurde eins gesetzt. **(A)** Zeitabhängige Inhibition der mRNA-Expression durch die exogene siRNA MDR-A **(B)** siRNA MDR-B abhängige Repression der mRNA-Expression im Verlauf von neun Tagen **(C)** Quantifizierung der MDR1 mRNA in den mit den einzelsträngigen siRNAs bzw. der siRNA gegen Luciferase transfizierten Zellen. Die Isolierung der Kontrollen erfolgte zwei Tage nach Transfektion (ns= nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.1.3 Reversion des Resistenzphänotyps durch siRNAs

Die oben beschriebenen Daten zeigen eine starke temporäre Reduktion der MDR1 mRNA- und Protein-Menge in den siRNA transfizierten Zellen. Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die Inhibition der Genexpression von MDR1 Einfluß auf die Zytostatikresistenz der transfizierten Zelllinien hat. Zu diesem Zweck wurde 24 Stunden nach der Behandlung mit anti-MDR1 siRNAs ein Zytotoxizitätsassays durchgeführt und die IC_{50} -Werte bestimmt (Fricker und Buckley, 1996; Voigt, 2005).

In beiden Tumorzelllinien des Gastrointestinaltrakts (EPP85-181RDB und EPG85-257RDB) zeigte die siRNA MDR-B eine ausgeprägtere chemosensitivierende Aktivität als die

siRNA MDR-A. Die 538-fache Resistenz der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB konnte durch die siRNA MDR-A auf 68-fach und durch siRNA MDR-B auf 57-fach gesenkt werden (Erniedrigung um 87 % bzw. 89 %). In der Magenkarzinomzelllinie wurde im Vergleich zur EPP85-181RDB eine deutliche wenn auch geringe Sensitivierung der Zellen erreicht. So erniedrigte sich der Resistenzfaktor durch die siRNA MDR-A in diesem Zellmodell um 52 % von 595-fach auf 310-fach. Eine 42 %ige Reduktion der Resistenz von 595-fach auf 250-fach war Folge der Transfektion mit der siRNA MDR-B. Für die Kontrollen konnten Änderungen bezüglich der Resistenz für den MDR-B *antisense*-Strang gezeigt werden. Der chemosensitivierende Effekt betrug in der EPP85-181RDB 32 % und in der EPG85-257RDB 52 % (Abbildung 11 und 12).

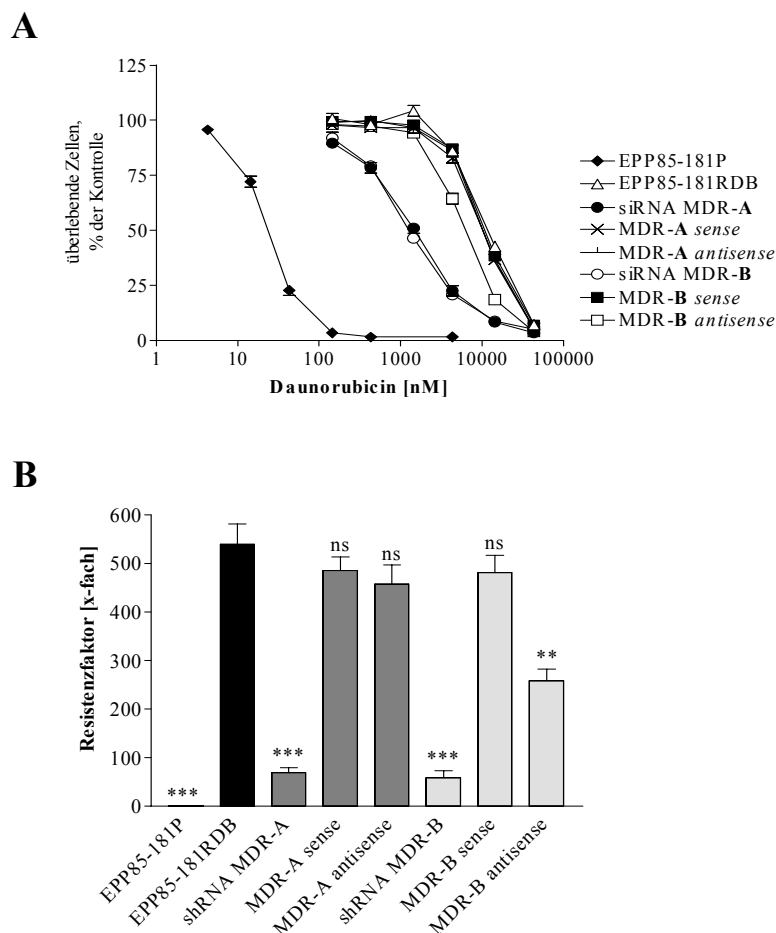


Abbildung 11: Zytotoxizitätsassay mit Daunorubicin in den siRNA transfizierten EPP85-181RDB

(A) Resistenzbestimmung der Zelllinien und Transfektanten gegenüber Daunorubicin. Die jeweils unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Relative IC₅₀-Werte im Verhältnis zur sensitiven Zelllinie EPP85-181P, die eins gesetzt worden ist. Die Signifikanzen wurden mit dem *student's t*-Test (zweiseitig) in Bezug auf die EPP85-181RDB berechnet (ns= nicht signifikant; ** = p<0,01; *** = p<0,001 (nach Nieth *et al.*, 2003)).

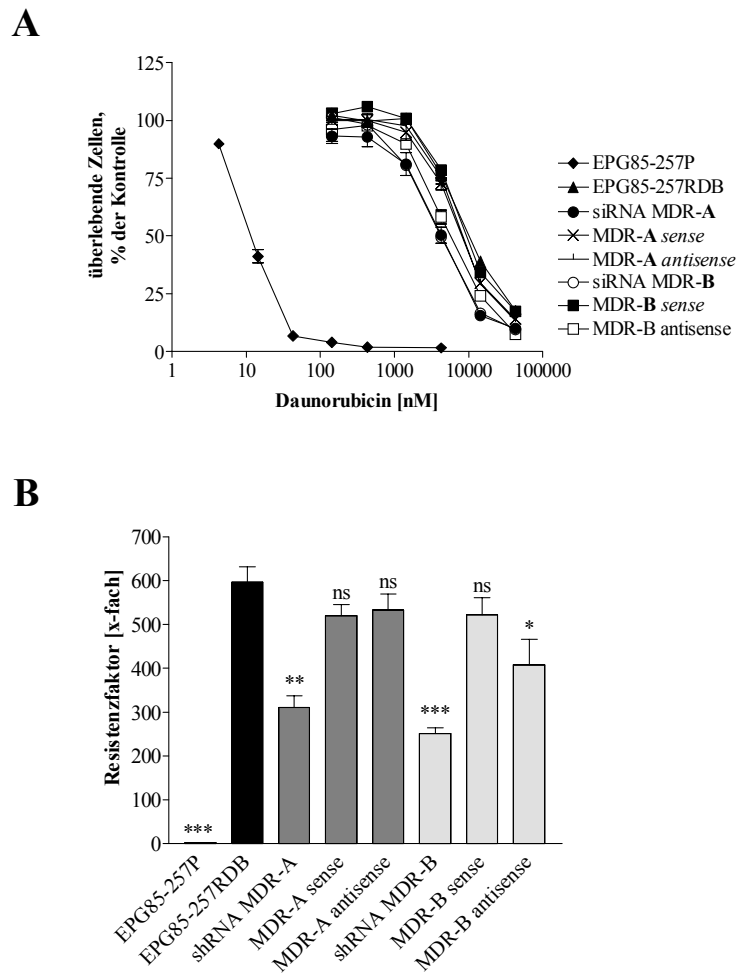


Abbildung 12: Zytotoxizitätsassay mit Daunorubicin in den siRNA transfizierten EPG85-257RDB

(A) Resistenzbestimmung der Zelllinien und Transfektanten gegenüber Daunorubicin. Die jeweils unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. (B) In diesem Balkendiagramm sind die relativen IC_{50} -Werte im Verhältnis zur sensitiven Zelllinie EPG85-257P, die eins gesetzt worden ist, dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit dem *student's t*-Test (zweiseitig) in Bezug auf die EPG85-257RDB (ns= nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$) berechnet (nach Nieth *et al.*, 2003).

In der zytostatika-resistenten Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR konnte mit beiden siRNAs eine Resensitivierung gegenüber Doxorubicin erreicht werden (Abbildung 13). Die Applikation der siRNA MDR-A führte zu einer Resistenzerniedrigung von 36-fach auf 10-fach (Reduktion um 72 %). Der Resistenzphänotyp konnte durch die siRNA MDR-B um 87 % in Bezug zu der Ausgangszelllinie erniedrigt werden. Die einzelsträngigen siRNAs sowie die anti-Luciferase siRNA hatten keine Sensitivierung der Zellen zur Folge.

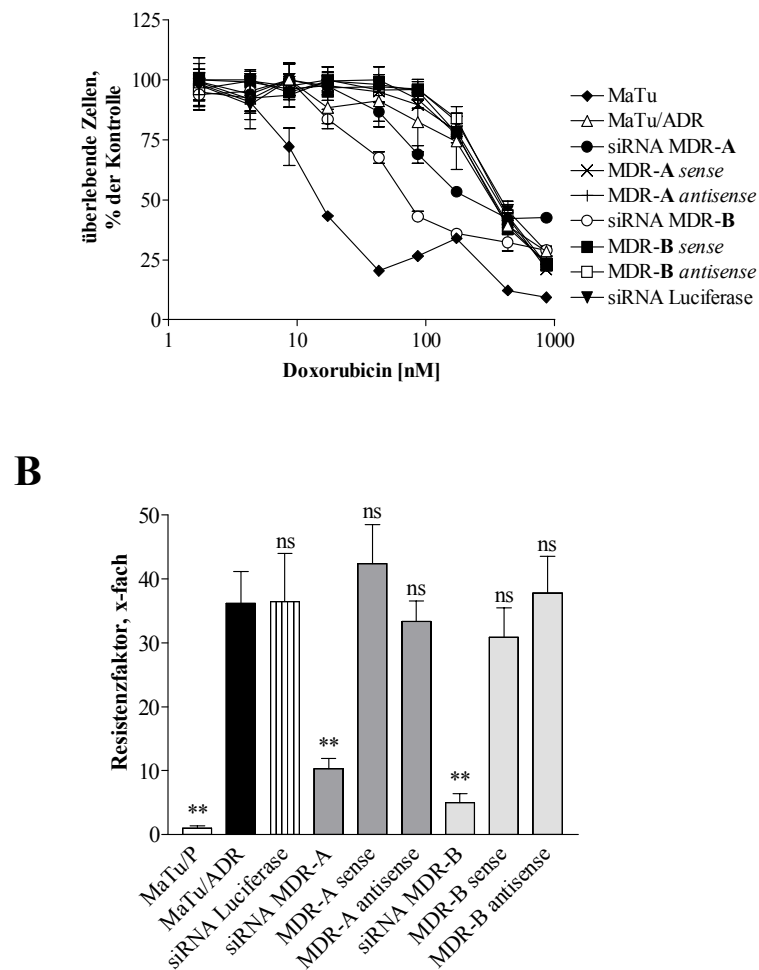


Abbildung 13: Zytotoxizitätsassay mit Doxorubicin in den siRNA transfizierten MaTu/ADR

(A) Resistenzbestimmung der Zelllinien und Transfektanten gegenüber Doxorubicin. Die jeweils unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. (B) In diesem Balkendiagramm sind die relativen IC_{50} -Werte im Verhältnis zur sensitiven Zelllinie MaTu, die eins gesetzt worden ist, dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit dem *student's t*-Test (zweiseitig) in Bezug auf die MaTu/ADR (ns= nicht signifikant; ** = $p < 0,01$) berechnet.

Nachstehend sind die Ergebnisse aus der MDR1 mRNA-Quantifizierung und der Resistenzbestimmung aller Tumorzelllinien zusammengefaßt (Tabelle 12). Die Hemmung der MDR1 mRNA-Expression lag zwischen 65 und 91 % und die Repression der Resistenzphänotyps zwischen 48 – 89 %.

Tabelle 12: Vergleich des Resistenzphänotyps der untersuchten Karzinomzelllinien nach der transienten Transfektion von anti-MDR1 siRNAs

<i>Reversion</i> ¹	EPP85-181RDB	EPG85-257RDB	MaTu/ADR
siRNA MDR-A			
der mRNA-Überexpression um	87 % ²	87 % ²	65 % ³
des Resistenzphänotyps um	87 %	48 %	72 %
siRNA MDR-B			
der mRNA-Überexpression um	91 % ²	74 % ²	77 % ³
des Resistenzphänotyps um	89 %	58 %	87 %
Referenz	Nieth <i>et al.</i> , 2003	Nieth <i>et al.</i> , 2003	
¹ in Bezug auf die resistente Zelllinie			
² Repression der MDR1 mRNA-Expression an Tag 2			
³ maximale Repression der MDR1 mRNA-Expression			

3.2 Posttranskriptionelle Genregulation durch anti-MDR1 shRNA-kodierende Vektoren in stabilen Transfektanten

3.2.1 Konstruktion eines Vektors zur endogenen Expression von shRNAs

Die Verwendung von chemisch synthetisierten anti-MDR1 siRNAs führte in den untersuchten Zellmodellen zu einer bis zu 89 %igen Aufhebung des Resistenzphänotyps (siehe Kap. 3.1 und Nieth *et al.*, 2003). Da eine massive, aber keine vollständige Inhibition MDR1-Expression in den Zellmodellen erreicht werden konnte und sich diese nur über einen Zeitraum von maximal fünf Tagen aufrecht erhalten ließ, wurden humane Expressionssysteme entwickelt, welche endogen anti-MDR1 shRNAs (*short hairpin* RNAs) exprimieren. Ziel war es eine dauerhafte Aufhebung des MDR1-abhängigen Resistenzphänotyps zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde das Vektorsystem psiRNA-hH1 (InvivoGen) ausgewählt, welches über einen RNA-Polymerase III-abhängigen H1 Promotor verfügt. Polymerase III Promotoren kontrollieren regulär in der Zelle die Transkription kurzer RNA-Moleküle ohne Poly-A-Schwanz (z.B. tRNAs), wodurch sie sich sehr gut für die Synthese von definierten shRNAs eignen. Eine Abfolge von fünf Thymidinen (T5-Terminationssignal) initiiert den Transkriptionsabbruch nach dem zweiten Uridin. Das entstandene Transkript weist am 3'-Ende einen 2 nt langen Überhang auf, der sich auch in synthetischen siRNAs wiederfindet und diese stabilisiert. Hinter diesen Promotor wurden zwei siRNA-kodierende Sequenzen (*sense* und *antisense*), die durch eine Verbindungsschleife (*Loop*) voneinander getrennt sind, kloniert. Nach der Expression nimmt das partielle selbst-komplementäre Transkript eine Haarnadelkonformation an, indem es interne Basenpaarungen ausbildet. Im Zytoplasma erfolgt anschließend die Prozessierung der shRNA durch den Dicer zu siRNAs (Abbildung 14).

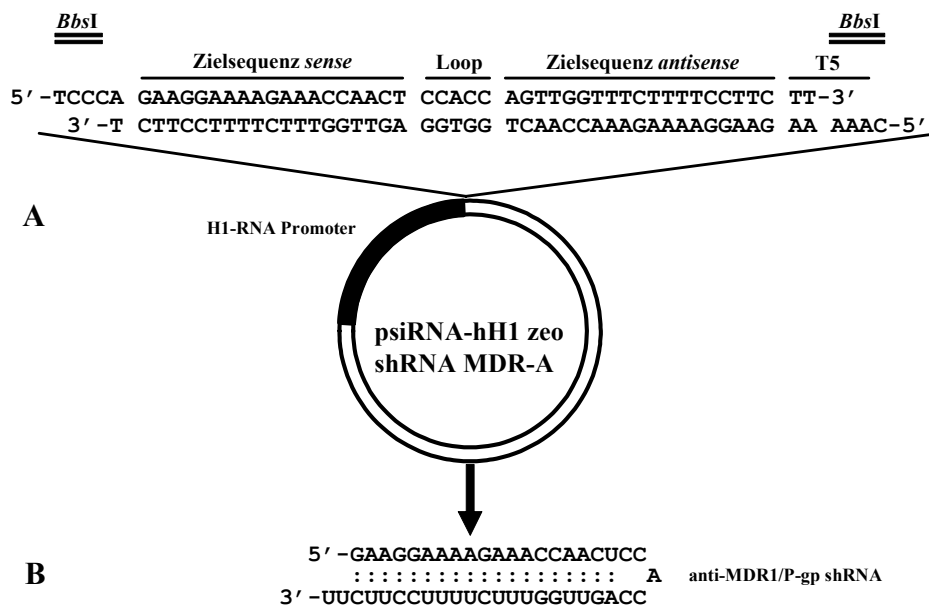


Abbildung 14: Darstellung des Vektorsystems

(A) Sequenz der chemisch synthetisierten shRNA MDR-A DNA-Oligonukleotide mit einer schematischen Darstellung des Expressionssystems. (B) Voraussichtliche Struktur der transkribierten shRNA MDR-A, welche anschließend durch den intrazellulären Dicer in siRNAs prozessiert wird (nach Stege *et al.*, 2004).

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden shRNA-kodierende Vektoren mit verschiedenen Zielsequenzen und Größen der Verbindungsschleife hergestellt und transfiziert. Die shRNAs MDR-A und MDR-B entsprechen dabei in ihrer Zielsequenz den oben beschriebenen und bereits publizierten siRNAs (Nieth *et al.*, 2003). Bei der Umsetzung der siRNA MDR-B in shRNA-kodierende Oligonukleotide ergab sich jedoch die theoretische Möglichkeit, daß es aufgrund einer am 3'-Ende der Zielsequenz (*antisense*) liegenden Abfolge von zwei Thyminiden zu einem verfrühten Transkriptionsabbruch kommt (Abbildung 15).

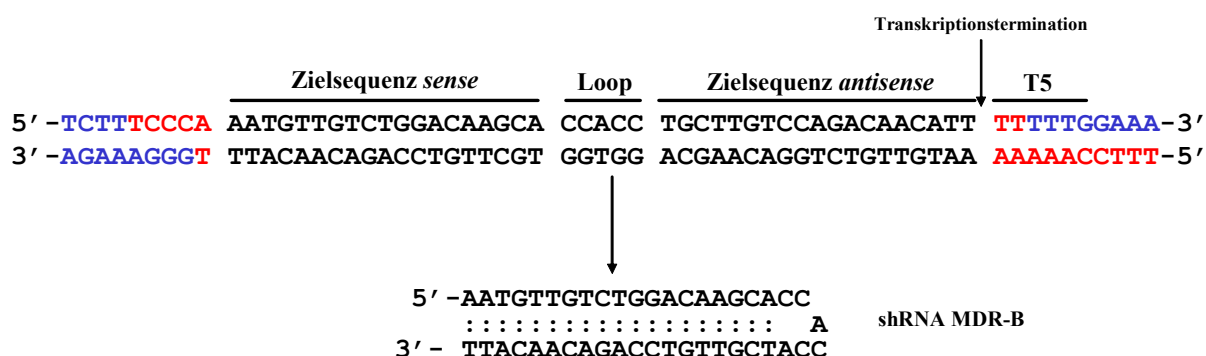


Abbildung 15: Sequenz der chemisch synthetisierten shRNA MDR-B DNA-Oligonukleotide

Die roten Sequenzbereiche stellen die *Bbs*I-Überhänge der Oligonukleotide dar, während die blauen Bereiche Bestandteil des Vektors psiRNA-hH1 sind. T5 bezeichnet das Terminationssignal der RNA-Polymerase III. Unten ist die voraussichtliche Struktur der transkribierten shRNA MDR-B abgebildet.

Aus diesem Grund wurden zwei zusätzliche shRNAs (shRNA MDR-C und -D) konstruiert, deren Modulation in einer um zwei Nukleotide stromabwärts versetzte Zielsequenz bestand. Weiterhin wurde in der shRNA MDR-C die Verbindungsschleife auf 9 nt Länge vergrößert, um deren mögliche Einfluß zu untersuchen. Zur besseren Verständlichkeit sind nachstehend die verschiedenen shRNAs mit ihrer Bezeichnung und ihrer Zielsequenz aufgeführt (Tabelle 13). Als Kontrollvektoren für die anschließenden Transfektionsanalysen dienten neben dem Ausgangsvektor psiRNA-hH1 auch ein anti-GFP shRNA kodierender Vektor, dessen Transkript keine Zielsequenz in der mRNA der Zellen erkennt.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten shRNAs und ihrer Zielsequenz

Konstrukt	Zielsequenz	Verbindungsschleife
shRNA MDR-A ¹	entspricht siRNA MDR-A; nt 503 - 528	CCACC ²
shRNA MDR-B ¹	entspricht siRNA MDR-B; nt 5050 - 5070	CCACC ²
shRNA MDR-C	veränderte siRNA MDR-B; nt 5052 – 5072	UUCAAGAGA ³
shRNA MDR-D	veränderte siRNA MDR-B; nt 5052 - 5072	CCACC ²

¹ Stege *et al.*, 2004; ² Jacque *et al.*, 2002 ;³ Brummelkamp *et al.*, 2002

Nach der Klonierung der shRNA-kodierenden Oligonukleotide in den eukaryotischen Expressionsvektor wurden die Bakterienklone anhand einer *AseI* Restriktion auf die Insertion kontrolliert. Nach dieser Restriktion sollten beim Ausgangsvektor, der zwei dieser Restriktionsschnittstellen trägt, zwei Fragmente von 1811 bp und 1127 bp Länge entstehen. In den shRNA-kodierenden Vektoren hingegen sollte es lediglich zu einer Linearisierung kommen. Ursache dafür ist die Entfernung der *AseI* Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle durch eine der Klonierung vorausgegangenen Restriktion mit *BbsI* (Abbildung 16). Im Anschluß wurde die korrekte Insertion mittels Sequenzierung bestätigt.

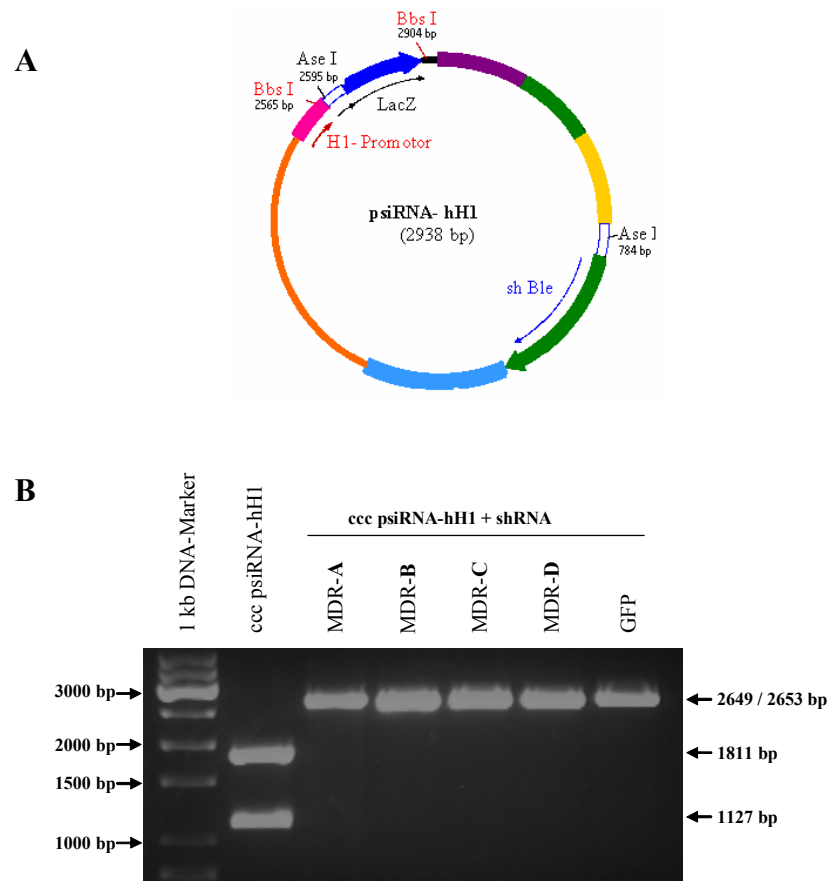


Abbildung 16: Vektorkarte und Restriktionsanalyse verschiedener Bakterienklone

(A) Vektorkarte des psiRNA-hH1 Vektors mit Restriktionsschnittstellen **(B)** Zur Diskriminierung zwischen dem parental Expressionsvektor und shRNA-kodierenden Vektoren wurde ein *AseI* Verdau durchgeführt. Eine Insertion der shRNA Oligonukleotide hatte nur eine Linearisierung des Plasmids zur Folge, während der parental Vektor noch zwei Schnittstellen enthielt, die zu zwei Schnittprodukten führten.

3.2.2 MDR1-Expression in den stabilen Transfektanten

Nach der Transfektion der shRNA-kodierenden Vektoren, des nicht modifizierten Ausgangsvektors psiRNA-hH1 und des anti-GFP shRNA-kodierenden Vektors in die Zelllinien EPP85-181RDB, EPG85-257RDB und MaTu/ADR wurden jeweils 24 anti-MDR1 shRNA Transfektanten und jeweils 12 Kontrolltransfektanten (12 psiRNA-hH1 und 12 anti-GFP shRNA) mit Zeocin selektioniert und etabliert. Im Folgenden wurde die RNA aller Zellklone extrahiert und Northern Blot Analysen zur Untersuchung der MDR1 mRNA-Expression durchgeführt.

Alle Kontrolltransfektanten zeigten ein der Ausgangszelllinien entsprechendes MDR1 mRNA-Niveau auf. In der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB konnte durch keine der shRNA Konstrukte eine Verminderung der MDR1 mRNA-Menge in den etablierten Klonen erreicht werden. Auch die Integration des shRNA MDR-**B** Expressionvektors führte in keinem Zellmodell zu einer Veränderung der MDR1 mRNA-Expression.

Durch Transfektion der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB konnten zwei shRNA MDR-**A** Transfektanten mit einer fast kompletten Repression der MDR1 mRNA etabliert werden, 13 zeigten eine mittlere Expressionshöhe und bei neun Transfektanten wurde keine Veränderung zur resistenten Ausgangszelllinie EPG85-257RDB detektiert. Ferner konnten sowohl in der Magen- als auch in der Mammakarzinomzelllinie jeweils drei Transfektanten (shRNA MDR-**C** bzw. -**D** Vektor) mit einer starken Herunterregulation der MDR1 mRNA-Expression, etabliert werden. Die verbliebenen Zellklone zeigten keine oder nur mäßige Effekte (Abbildung 17).

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden für die nachfolgenden Experimente nur jeweils einer der anti-MDR1 shRNA Klone und jeweils einer der Kontrolltransfektanten (psiRNA-hH1 bzw. shRNA GFP) ausgewählt.

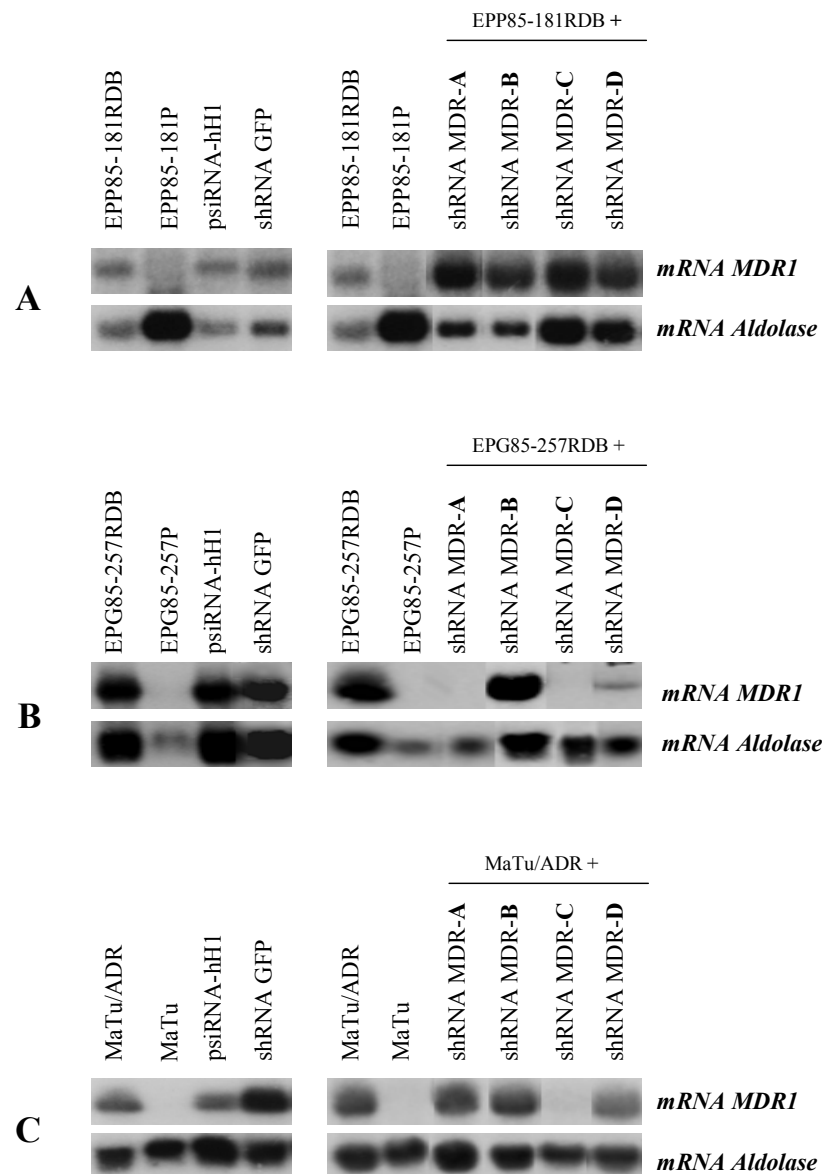


Abbildung 17: MDR1 mRNA-Expression in den shRNA-Transfektanten.

(A) Northern Blot Analyse zum Nachweis der MDR1 mRNA Inhibierung durch anti-MDR1 shRNAs in der Pankreaskarzinomzelllinie. (B) Nachweis der MDR1 mRNA in der anti-MDR1 shRNA transfizierten EPG85-257RDB. (C) MDR1 mRNA-Expression in der resistenten Mammakarzinomzelllinie nach Transfektion mit anti-MDR1 shRNAs.

3.2.3 Nachweis der Expressionsvektoren in den Effekttransfektanten

Zum Nachweis der Insertion der Expressionsvektoren in die Effekttransfektanten wurde eine Vektor-spezifische PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer binden stromauf- und stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle auf dem Vektor, so daß anhand der Länge des PCR-Produkts zwischen Ausgangsvektor (psiRNAh-H1) und den shRNA-kodierenden Vektoren unterschieden werden kann.

Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, konnte in den shRNA GFP bzw. shRNA-Transfektanten ein PCR-Produkt von 397 bp amplifiziert werden. Dieses PCR-Amplifikat entspricht dem des shRNA MDR-A kodierenden Vektors, welcher als Positivkontrolle mitgeführt worden ist. Die mit dem Ausgangsvektor transfizierte Zelllinie und das Vektortemplate zeigten ein PCR-Produkt von 686 bp Länge. Aus den untransfizierten Ausgangszelllinien konnte erwartungsgemäß kein PCR-Produkt amplifiziert werden.

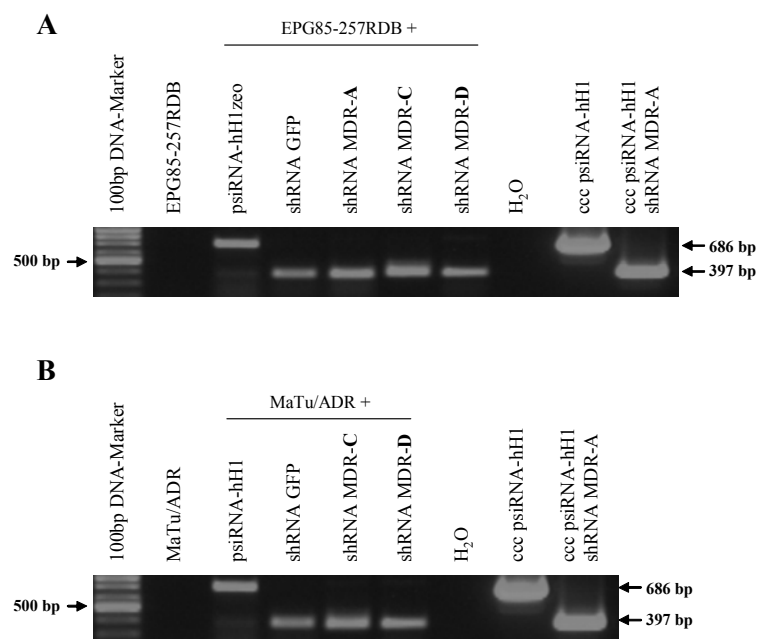


Abbildung 18: Vektor- und Aldolase-spezifische PCR

Die Abbildung zeigt den Nachweis des shRNA-kodierenden Vektors in genomischer DNA mittels PCR (397 bp shRNA Transfektanten, 686 bp Ausgangsvektor). **(A)** Nachweis der Insertion für die shRNA-Transfektanten der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB **(B)** sowie der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR.

3.2.4 Effekte auf die P-Glykoprotein-Synthese

Die zelluläre Expression des transmembranständigen ABC-Transporters P-Glykoprotein wurde in den shRNA-exprimierenden Transfektanten mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Zum einen wurde mittels Western Blot Analyse der Gehalt von MDR1 in den Zelllinien sowie deren abgeleiteten Effektklonen bestimmt. Zum anderen erfolgte eine immunzytochemische Färbung der untersuchten Zelllinien.

In Übereinstimmung mit den Daten zur MDR1 mRNA-Expression geht aus der Western Blot Analyse hervor, daß in den Kontrolltransfektanten es zu keinen Veränderungen des Proteingehalts gekommen ist. Dies gilt für beide Zelllinien. Die Transfektion von

shRNA-kodierenden Vektoren führte in beiden Zelllinien zu einer starken Reduktion des zellulären P-Glykoproteingehalts (Abbildung 19).

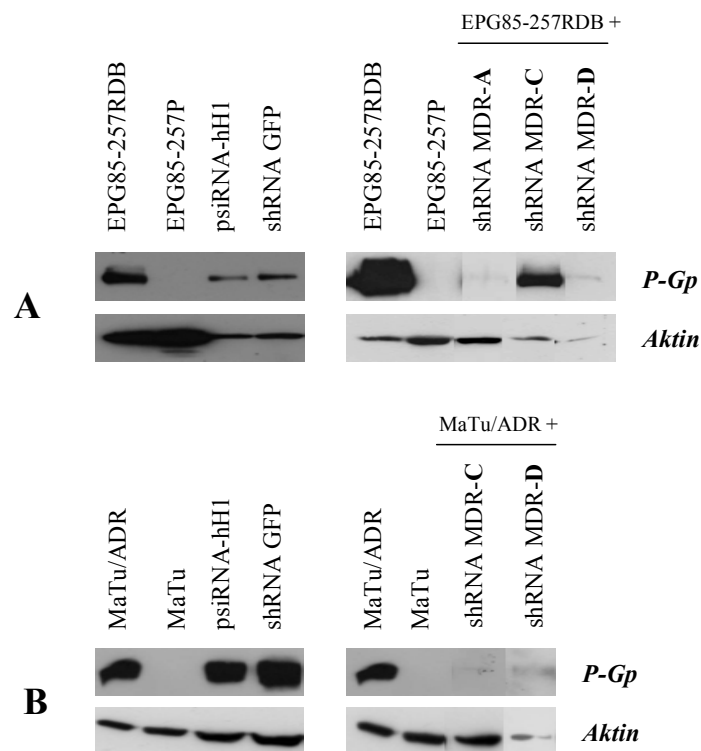


Abbildung 19: Bestimmung des P-Glykoproteingehalts mittels Western Blot

(A) Bestimmung des Proteingehalts von P-Glykoprotein (170 kDa, obere Banden) mit Hilfe des mAb C219 und zur Ladekontrolle mit Aktin mit dem mAb anti-Aktin (42 kDa, untere Bande) in den Effektttransfektanten der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB. (B) Zellulärer Gehalt an P-Glykoprotein in den Transfektanten der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR.

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen P-Glykoprotein (mAb C219) erfolgte der immunzytochemische Nachweis in den untersuchten Zellen. Für die resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB konnte eine starke Überexpression von P-Glykoprotein (MDR1) im Vergleich zur sensiblen Zelllinie nachgewiesen werden. Gleiches trifft auch für die Kontrolltransfektanten, die den unmodifizierten Ausgangsvektor psiRNA-hH1 bzw. shRNA GFP exprimieren, zu. Im Gegensatz dazu konnte in allen anti-MDR1 shRNA-Effektklonen nur eine geringe oder gar keine P-Glykoprotein-Expression detektiert werden (Abbildung 20).

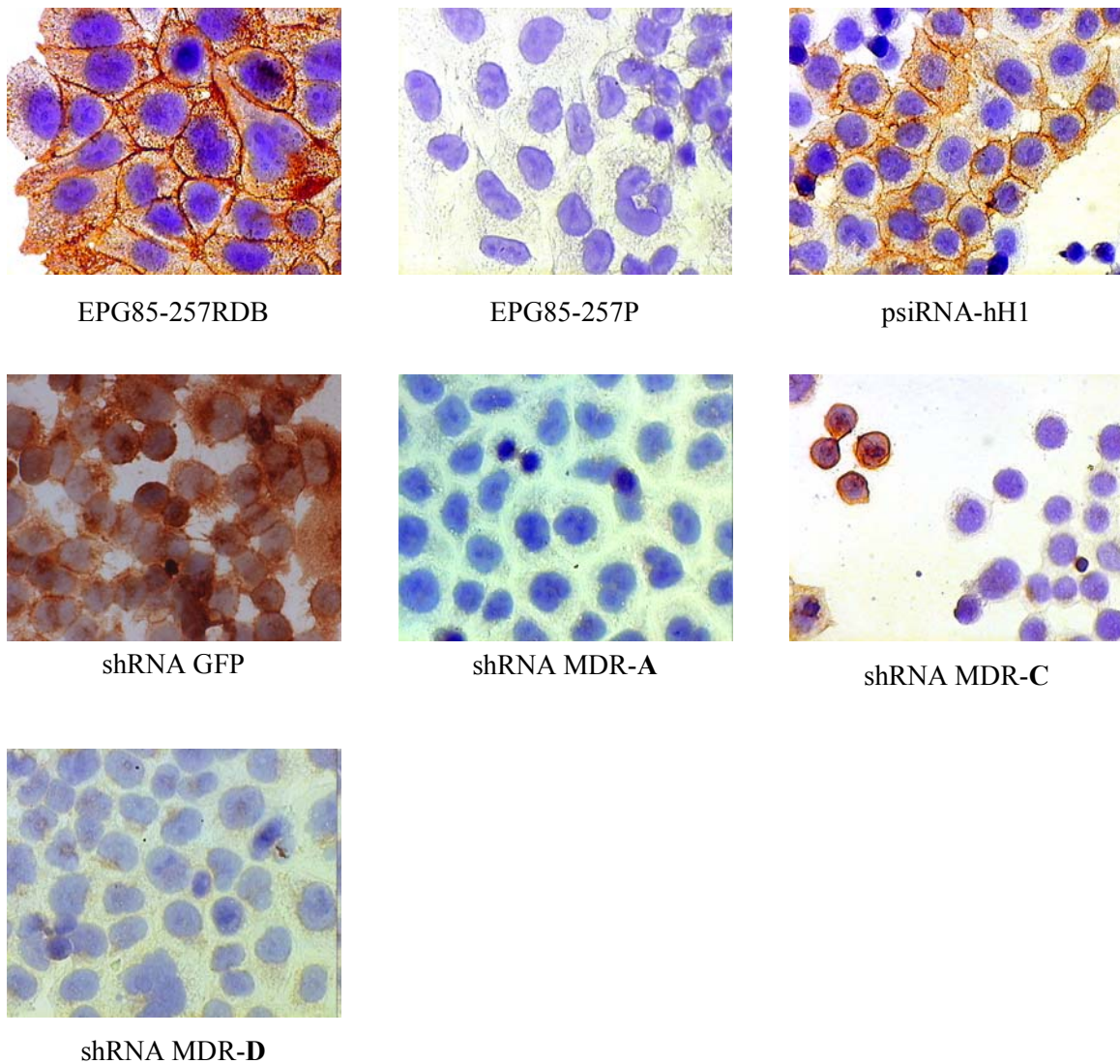


Abbildung 20: Immunzytochemischer Nachweis des P-Glykoproteins

Die Expression des ABC-Transporters P-Glykoprotein in der Magenkarzinomzelllinie und den Transfektanten wurde immunzytochemisch mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers C219 detektiert.

Durch die immunzytochemische Detektion von P-Glykoprotein konnte gezeigt werden, daß in der resistenten Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR der ABC-Transporter im Vergleich zur sensiblen Zelllinie stark überexprimiert ist. Die Kontrolltransfektanten zeigten ebenfalls eine starke membranständige Färbung. Die anti-MDR1 shRNA-Effektklone hingegen zeigten eine stark verringerte P-Glykoprotein-Expression (Abbildung 21).

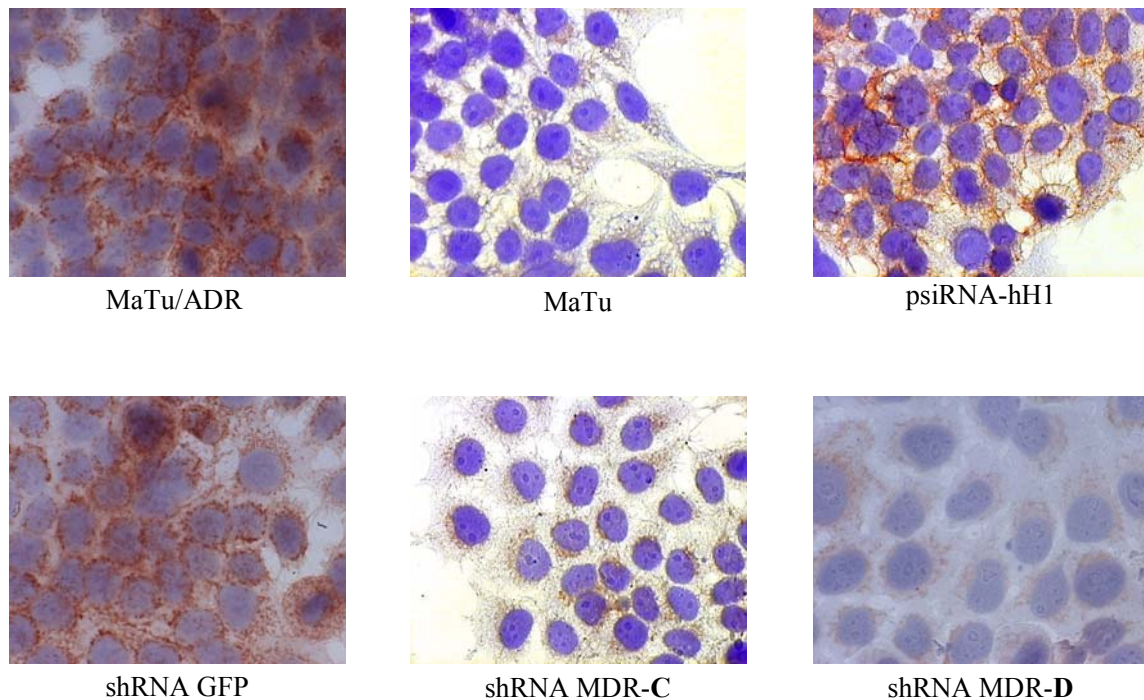


Abbildung 21: Immunzytochemischer Nachweis des P-Glykoproteins

Die Expression des ABC-Transporters P-Glykoprotein in der Mammakarzinomzelllinie und den Transfektanten wurde immunzytochemisch mit Hilfe von mAb C219 detektiert.

3.2.5 Verhalten der Ausgangszelllinie und der Transfektanten bei Zytostatikabehandlung

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit die Repremierung der MDR1 mRNA durch endogene anti-MDR1 shRNAs Auswirkungen auf den Resistenzphänotyp hatten. Zu diesem Zweck wurden die sensitiven und die resistenten Sublinien in einem Zytotoxizitätsassay mit den Transfektanten verglichen sowie die IC_{50} -Werte berechnet. Anhand der ermittelten IC_{50} -Werte konnten im Anschluß die Resistenzniveaus gegenübergestellt werden.

In der shRNA MDR-A Transfektanten der Magenkarzinomzelllinie konnte eine komplette Reversion des Resistenzphänotyps durch endogene shRNAs erreicht werden. In der Transfektante shRNA MDR-C wurde die Resistenz ebenfalls auf das Niveau der sensitiven Zelllinie gesenkt. Die anti-MDR1 shRNA-Expression führte in dem shRNA MDR-D Klon zu einer 92 %igen Reduktion der Resistenz. Bei den Kontrollvektoren konnte kein signifikanter Einfluß auf die Sensitivität gegenüber Daunorubicin nachgewiesen werden (Abbildung 22).

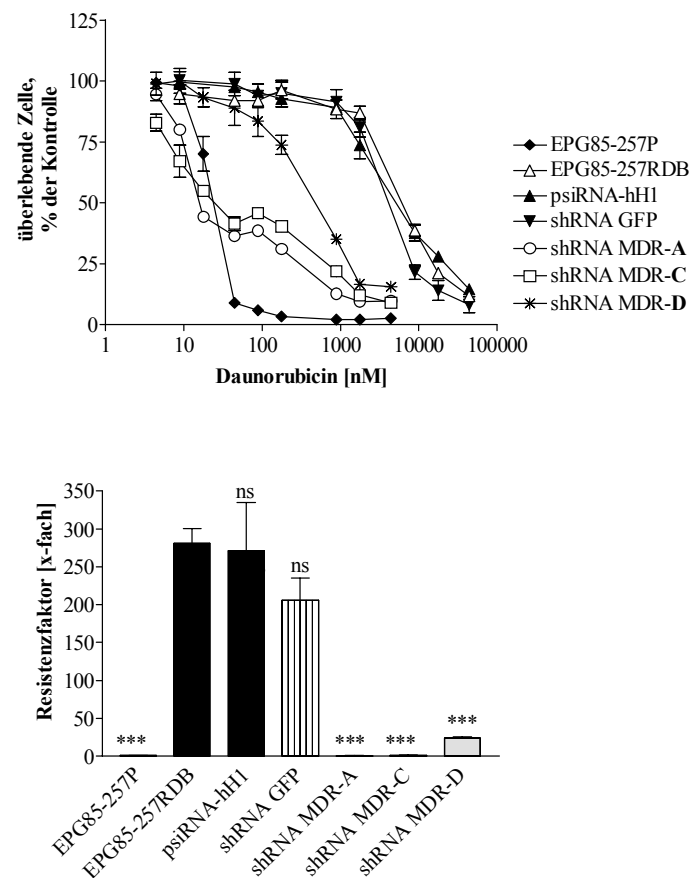


Abbildung 22: Zytotoxizitätsassay mit Daunorubicin

(A) Resistenzbestimmung der Zelllinien und Transfektanten gegenüber Daunorubicin. Die jeweils unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Relative IC_{50} -Werte im Verhältnis zur sensitiven Zelllinie EPG85-257P, die eins gesetzt worden ist. Die Signifikanzen wurden mit dem *student's t*-Test (zweiseitig) in Bezug auf die EPG85-257RDB berechnet (ns= nicht signifikant; *** = $p < 0,001$).

In den shRNA MDR-C exprimierenden Transfektanten der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR konnte eine starke Resistenzerniedrigung um 89 % erreicht werden. Die shRNA MDR-D Effektttransfektante zeigte eine annähernd komplette Reversion des Resistenzphänotyps mit einer Reduktion um 95 % auf 5 % des ursprünglichen Niveaus. Die Kontrollen, bestehend aus der Vektortransfektanten (psiRNA-hH1) und der anti-GFP shRNA Transfektanten, zeigten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Sensitivität der Zellen gegenüber Doxorubicin (Abbildung 23).

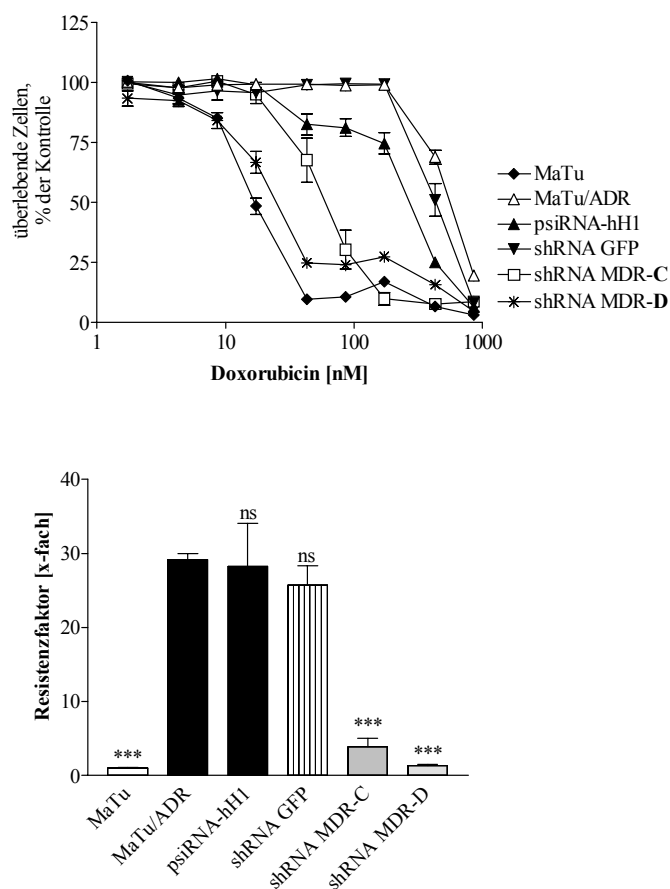


Abbildung 23: Zytotoxizitätsassay mit Doxorubicin

(A) Resistenzbestimmung der Zelllinien und Transfektanten gegenüber Doxorubicin. Die jeweils unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** In diesem Balkendiagramm sind die relativen IC_{50} -Werte im Verhältnis zur sensitiven Zelllinie MaTu, die eins gesetzt worden ist, dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit dem *student's t*-Test (zweiseitig) in Bezug auf die MaTu/ADR berechnet (ns= nicht signifikant; *** = $p < 0,001$).

In Tabelle 14 sind die ermittelten IC_{50} -Werte und die Resistenzfaktoren für alle untersuchten Zelllinien zusammengefasst. Die angegebenen IC_{50} -Werte stellen Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar. Bei der Berechnung der Resistenzfaktoren wurde jeweils der Mittelwert der sensitiven Zelllinie als Bezug gewählt. Die Signifikanz hingegen wurde im Vergleich zur der resistenten Ausgangszelllinie mit dem ungepaarten, zweiseitigen *student's t*-Tests berechnet (ns= $> 0,05$ nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$).

Tabelle 14: IC₅₀-Werte und Resistenzfaktoren der untersuchten Zelllinien

Transfektanten	IC ₅₀ -Wert [nM]	Resistenzfaktor [x-fach]	
EPG85-257P	26,29 ± 3,76	1,00 ± 0,14	***
EPG85-257RDB	7385,00 ± 521,30	280,90 ± 19,83	-
EPG85-257RDB <i>psiRNA-hH1</i>	7128,00 ± 1673,00	271,00 ± 63,70	ns
EPG85-257RDB <i>shRNA GFP</i>	5413,00 ± 766,20	205,90 ± 29,14	ns
EPG85-257RDB <i>shRNA MDR-A</i>	20,55 ± 4,71	0,45 ± 0,16	***
EPG85-257RDB <i>shRNA MDR-C</i>	26,35 ± 10,23	1,00 ± 0,39	***
EPG85-257RDB <i>shRNA MDR-D</i>	612,40 ± 52,86	23,31 ± 2,02	***
<hr/>			
MaTu	15,91 ± 1,56	1,00 ± 0,1	***
MaTu/ADR	463,90 ± 13,09	29,16 ± 0,82	-
MaTu/ADR <i>psiRNA-hH1</i>	449,80 ± 91,40	28,29 ± 2,63	ns
MaTu/ADR <i>shRNA GFP</i>	434,30 ± 25,25	25,69 ± 2,63	ns
MaTu/ADR <i>shRNA MDR-C</i>	61,94 ± 18,11	3,84 ± 1,14	***
MaTu/ADR <i>shRNA MDR-D</i>	21,51 ± 2,18	1,35 ± 0,14	***

3.3 *In vivo* Applikation des shRNA MDR-C-kodierenden Vektors in MaTu/ADR abgeleiteten Tumoren

In den bisher (Kap. 3.1 und 3.2) dargestellten Ergebnissen konnte der Nachweis erbracht werden, dass exogene bzw. endogene siRNAs zur Induktion der RNA-Interferenz-abhängigen Degradation der MDR1 mRNA in Tumorzelllinien effektiv als gentechnisches Verfahren eingesetzt werden können. Gleichwohl stellt MDR1 aufgrund seiner Rolle in der klinischen Manifestation einer Multidrugresistenz ein wichtiges Untersuchungsobjekt für neue gentherapeutische Ansätze zur Unterstützung der klassischen Chemotherapie dar. In den sich nun anschließenden Versuchen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit durch anti-MDR1 shRNA-kodierende Vektoren *in vivo* eine Chemosensitivierung erreicht werden kann und dadurch ein therapeutisches Potential besteht. Als Tiermodell wurden NMRI:nu/nu Mäuse verwendet, die aufgrund ihrer Immundefizienz ein gutes Anwachsen einer subkutan injizierten Tumorzelllinie gewährleisten. In Vorversuchen stellte sich die Mammakarzinomzelllinie aufgrund des hohen Stellenwerts von Brustkrebs in der klinischen Praxis und wegen ihrer Wachstumseigenschaften auf der Maus als bestes Tumormodell heraus. Nach Prüfung der *in vitro* Daten wurde eine Applikation des hoch wirksamen shRNA MDR-C Konstrukts als sehr erfolgversprechend erachtet.

Vor Beginn der Untersuchungen im Mausmodell wurde ein Experiment durchgeführt, um die Expression der shRNA MDR-C durch das integrierte Vektorkonstrukt in der Mammakarzinomzelllinie nachzuweisen. Der Beweis erfolgte indirekt durch die Detektion der prozessierten siRNAs mittels Northern Blot. Zu diesem Zweck wurde aus der shRNA MDR-C Transfektante und den beiden Kontrolltransfektanten (psiRNA-hH1 und shRNA GFP) extrahierte miRNA elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und anschließend mit der *antisense*-Sequenz der siRNA hybridisiert. Als Kontrolle diente die Detektion der U6snRNA (small nuclear RNA). Die Kontrolltransfektanten zeigten nach der Hybridisierung kein siRNA-spezifisches Signal. In dem shRNA MDR-C Klon hingegen konnte die Expression nachgewiesen werden (Abbildung 24).

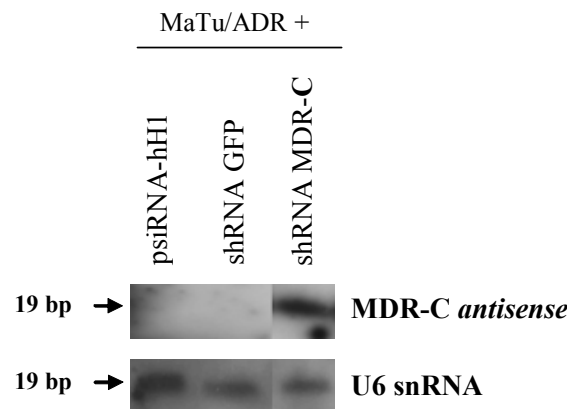


Abbildung 24: Expression der siRNA in der stabilen shRNA MDR-C Transfektanten der Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR

3.3.1 Quantifizierung der MDR1 mRNA-Expression im Tumorgewebe

Zunächst wurde der Einfluß des via Jet-Injektion applizierten shRNA MDR-C kodierenden Vektors auf die Expression der MDR1 mRNA in Mäusetumoren untersucht. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen 1×10^7 Zellen der doxorubicin-resistenten Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR subkutan transplantiert. 19 Tage nach der Transplantation, dies entsprach einem Tumordurchmesser von 6 mm, wurden die Expressionsvektoren (psiRNA-hH1 oder shRNA MDR-C) mittels Jet-Injektion ($4 \times 10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) in den Tumor eingebracht. Nach einem, zwei und drei Tagen wurden die Mäuse getötet, der Tumor isoliert, Schnitte hergestellt und RNA isoliert. Anschließend wurde die MDR1 mRNA-Expression mittels *real-time* RT-PCR quantifiziert.

Abbildung 25 zeigt, daß der Ausgangsvektor keinen signifikanten Effekt auf die MDR1 mRNA-Expression hatte. In dem shRNA MDR-C exprimierenden Tumorgewebe hingegen konnte eine zeitabhängige Reversion der MDR1 mRNA-Expression erreicht werden. Die maximale Repression der MDR1 mRNA war am 2. Tag mit einer 92 %igen Reduktion im Bezug auf das Ausgangsniveau nachweisbar.

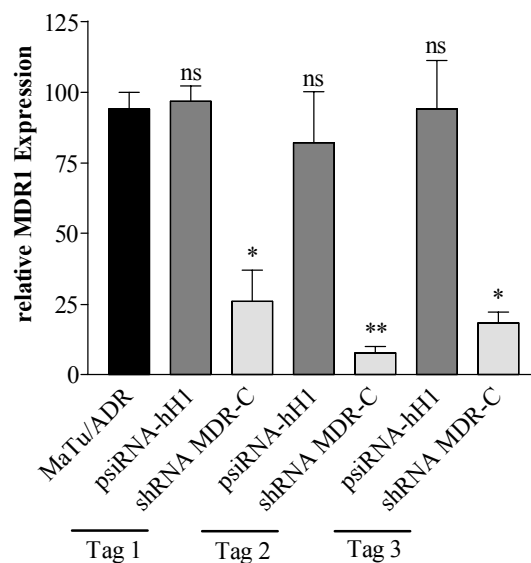


Abbildung 25: Quantifizierung der MDR1 mRNA-Expression in Tumorgeweben

Dargestellt ist die relative MDR1 mRNA-Expression, normalisiert auf die GAPDH mRNA-Expression. Die MDR1/GAPDH Ratio der MaTu/ADR wurde 100 gesetzt. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaartem, zweiseitigen *student's t*-Test in Bezug auf die MaTu/ADR (ns= nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$) berechnet (nach Stein *et al.*, eingereicht).

3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von P-Glykoprotein im Tumor

Ausgehend von dem oben genannten Versuchsaufbau wurde aus den gleichen Tumorbereichen Schnitte für den immunchemischen Nachweis von P-Glykoprotein hergestellt. Die Detektion des membranständigen Proteins mit dem monoklonalen Antikörper C219 zeigte für diejenigen Tumoren, die aus den mit dem Ausgangsvektor (psiRNA-hH1) behandelten Mäusen entnommen worden sind, eine gleichbleibend starke Färbung. Im Kontrast dazu führte die Applikation des shRNA MDR-C kodierenden Vektors zu einer starken Reduktion der P-Glykoprotein-Synthese (Abbildung 26). Zusammengefaßt führte die intratumorale Jet-Injektion des anti-MDR1 shRNA Vektors sowohl zu einer Inhibition der mRNA-Expression als auch der Proteinsynthese in den Tumoren der Mäuse.

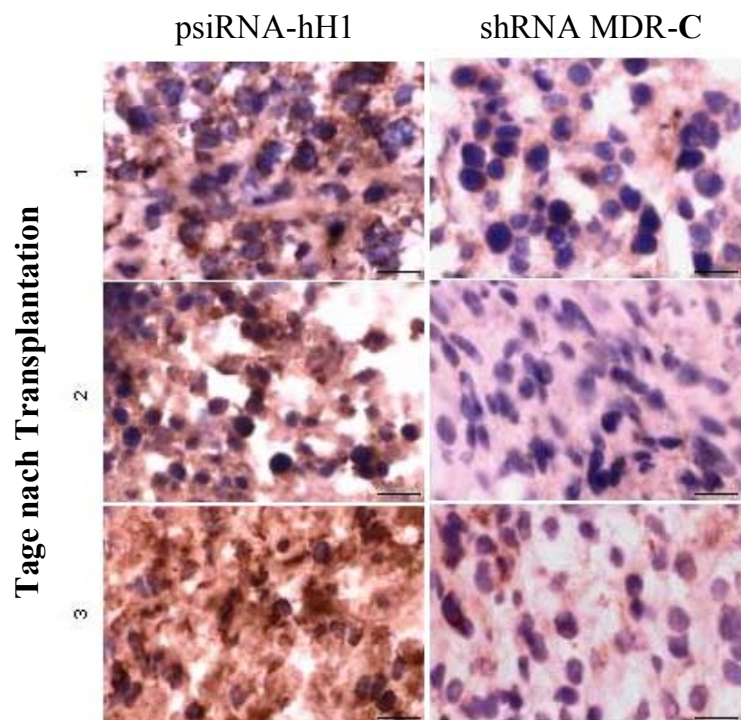


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung von P-Glykoprotein mit mAb C219

Nachweis von P-Glykoprotein in MaTu/ADR-abgeleiteten Tumoren nach Jet-Injektion des shRNA MDR-C kodierenden Vektors oder des Ausgangsvektors (psiRNA-hH1). Exemplarische Darstellung eines Tieres pro Gruppe an Tag 1, 2 und 3 nach intratumoraler Injektion (nach Stein *et al.*, eingereicht).

3.3.3 Chemosensitivierung von MaTu/ADR-abgeleiteten Maustumoren nach der Applikation des shRNA MDR-C kodierenden Vektors

Im Folgenden wurde mit sechs verschiedenen Behandlungsschemata (siehe Abbildung 27) an jeweils sechs Mäusen pro Gruppe der Einfluß der Expression der shRNA MDR-C untersucht. Zu diesem Zweck transplantierte man immundefizienten Mäusen subkutan Zellen der P-Glykoprotein-exprimierenden Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR bzw. der chemosensiblen MaTu. Nach 19 Tagen und nach 27 Tagen erfolgte die intratumorale Applikation des shRNA MDR-C kodierenden Expressionsvektors bzw. des nicht modifizierten Kontrollvektors (psiRNAh-H1) mittels *low-volume* Jet-Injektion (Walther *et al.*, 2002). Die Behandlung der Tiere mit 8 mg/kg Doxorubicin oder PBS wurde intravenös an den Tagen 22 und 30 durchgeführt. An den Tagen 0, 19, 22, 27, 30, 33, 36 und 40 erfolgte jeweils die Bestimmung des Tumervolumens.

Die Injektion des shRNA MDR-C-exprimierenden Vektors kombiniert mit der Doxorubicingabe (shRNA MDR-C i.t. + Doxo i.v.; ●) führte im Vergleich zur Kombinationstherapie bestehend aus dem Kontrollvektor und Doxorubicin (psiRNA-hH1 i.t.

+ Doxo i.v.; ▲;* p= 0,0156) bzw. PBS und Doxorubicin (PBS i.t. + Doxo i.v.; ■; ** p=0,0156) zu einer signifikanten Repression des Tumorwachstums. Am vierzigsten Tag war das Tumolvolumen derjenigen Versuchsgruppe, welche mit dem shRNA MDR-C Vektor und dem Doxorubicin behandelt worden ist, um 50 % reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe mit dem Ausgangsvektor und der Doxorubicinbehandlung. Versuchsgruppen, die den shRNA-Expressionsvektor (shRNA MDR-C i.t. + PBS i.v.; ○) bzw. den Ausgangsvektor (psiRNA-hH1 i.t. + PBS i.v.; △) intratumoral appliziert bekommen haben, zeigten nach der Gabe von PBS keine Änderungen im Tumorwachstum im Vergleich zu den nur mit PBS behandelten Mäusen (PBS i.t. + PBS i.v.; □). Besonders hervorzuheben ist, daß das Tumolvolumen in der shRNA MDR-C/Doxo-Gruppe auf das Niveau der mit Doxorubicin behandelten MaTu-abgeleiteten Tumoren (PBS i.t. + Doxo i.v.; ◆) herabgesenkt war (Abbildung 27).

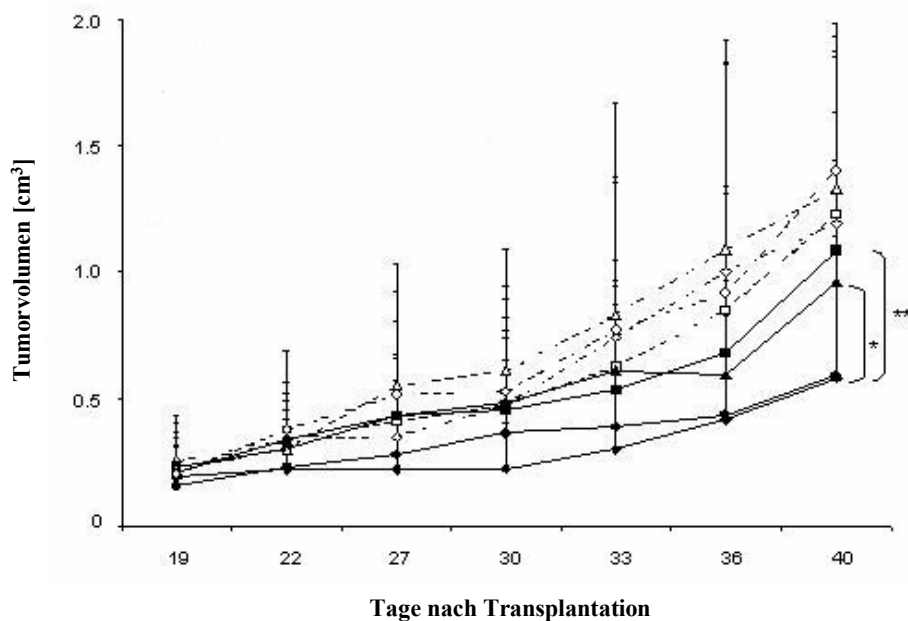


Abbildung 27: Abnahme des Tumorwachstums in der Maus nach kombinierter Applikation des shRNA MDR-C kodierenden Vektors und Doxorubicin im Verlauf von 40 Tagen

Die folgenden Behandlungsschemata wurden angewendet:

MaTu PBS i.t. + PBS i.v. (◇); MaTu PBS i.t. + Doxo i.v. (◆)
 MaTu/ADR PBS i.t. + PBS i.v. (□); MaTu/ADR PBS i.t. + Doxo i.v. (■)
 MaTu/ADR psiRNA-hH1 i.t. + PBS i.v. (△); MaTu/ADR psiRNA-hH1 i.t. + Doxo i.v. (▲)
 MaTu/ADR shRNA MDR-C i.t. + PBS i.v. (○); MaTu/ADR shRNA MDR-C i.t. + Doxo i.v. (●).

Die intratumorale Applikation erfolgte an den Tagen 19 und 27, während die intravenöse Behandlung der Mäuse mit PBS bzw. Doxorubicin an den Tagen 22 und 30 durchgeführt wurde (nach Stein *et al.*, eingereicht).

4 Diskussion

P-Glykoprotein als Genprodukt des *MDR1* Locus stellt einen gut untersuchten Mediator der Multidrugresistenz dar. Die Überexpression dieses ABC-Transporters steht in Korrelation zu einer erniedrigten Remission und einer kürzeren Überlebensrate (Chan *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1991; Pirker *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1992; Baldini *et al.*, 1995). Bisherige Versuche, das Protein über niedermolekulare Substanzen (MDR-Modulatoren) zu inhibieren, vermochten in allen bisherigen klinischen Studien nicht zu überzeugen, so daß diese bis heute keinen Eingang in Standardtherapieschemata gefunden haben. Auch die Ausbildung einer Resistenz (tertiäre Resistenz) gegen die verwendeten MDR-Modulatoren stellt ein nicht zu unterschätzendes Problem in einer klinischen Anwendung dar.

Zur effektiveren Überwindung der Multidrugresistenz ist es aus den oben genannten Gründen essentiell, weniger toxische und selektivere Strategien zu entwickeln. Ein idealer Ansatz für dieses Ziel ist die spezifische Suppression des *MDR1* Gentranskripts auf RNA-basierenden Strategien, wie z. B. *Antisense*-Oligonukleotiden (ASOs) und Ribozymen. Die *MDR1* mRNA-Expression konnte sowohl mittels der Applikation von *Antisense*-Oligonukleotiden (Liu *et al.*, 1996; Stuart *et al.*, 2000; Rittierodt *et al.*, 2004) als auch der Verwendung von *Hammerhead*-Ribozymen (Holm *et al.*, 1994; Kowalski *et al.*, 2005) *in vitro* gehemmt werden, was mit einer Modulierung des Resistenzphänotyps einherging. Seit der Entwicklung von siRNAs (RNA-Interferenz) zur Anwendung in Säugetierzellen steht der biomedizinischen Forschung eine weitere innovative Methode zur spezifischen Hemmung der Genexpression zur Verfügung. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß diese Technologie deutlich effizienter ist als *Antisense*-Oligonukleotide (Grünweller *et al.*, 2003; Miyagishi *et al.*, 2003). Daher sollten in der vorliegenden Arbeit RNA-Interferenz Strategien entwickelt werden, die zur Modulierung der P-Glykoprotein-abhängigen Zytostatikaresistenz sowohl im Zellkultur- als auch im Tiermodell führen.

4.1 Modulation der MDR1 Biosynthese mittels anti-MDR1 siRNAs

Im Kapitell 3.1 konnte demonstriert werden, daß der P-Glykoprotein-abhängige MDR-Phänotyp durch synthetische siRNAs effektiv moduliert werden kann. In allen drei Zellmodellen führte die sequenzspezifische Degradation der MDR1 mRNA zu einer Abnahme des transmembranständigen Transportproteins, was wiederum eine drastische Resensitivierung der ursprünglich multidrug-resistenten Karzinomzelllinien gegenüber Anthrazyklinen zur Folge hatte.

Beide siRNA Duplexe zeigten eine signifikant erhöhte Gensuppressionsaktivität in der daunorubicin-resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene. Überdies war in diesem Zellmodell die Reversion des Anthrazyklinresistenz stärker ausgeprägt als in den beiden anderen.

Desweiteren zeigte die siRNA MDR-**B** in allen drei untersuchten Zelllinien eine erhöhte chemosensitivierende Aktivität. Für die gastrointestinalen Tumormodelle (EPP85-181RDB und EPG85-257RDB) kann dies mit der additiven *antisense*-Wirkung des MDR-**B** *antisense*-Strangs erklärt werden. Dieser MDR-revertierende Effekt korreliert mit dem verringerten Gehalt an MDR1 mRNA und Protein in diesen Kontrollzellen. Als weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Zugänglichkeit des Zielmoleküls für die siRNAs anzuführen. Während die siRNA MDR-**A** nach den damals in der Literatur üblichen Empfehlungen synthetisiert worden ist (Elbashir *et al.*, 2001), wurde die siRNA MDR-**B** homolog zu einer gut definierten *Hammerhead*-Ribozymschnittstelle, die unter Einbeziehung der Sekundärstruktur der Ziel-mRNA erfolgte, ausgewählt (Holm *et al.*, 1994). Inwieweit die Zugänglichkeit der mRNA tatsächlich einer Rolle für den effizienten Einsatz von siRNAs spielt, ist zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion (Harborth *et al.*, 2001; Vickers *et al.*, 2003). In unserer Arbeitsgruppe konnte an zwei weiteren Resistenz-assoziierten ABC-Transportern (BCRP und cMOAT) ähnliche Beobachtungen wie oben beschrieben gemacht werden. In diesen Studien waren gleichermaßen siRNAs, die gegen eine gut untersuchte Ribozymschnittstelle gerichtet waren aktiver als siRNAs gegen konventionell ausgesucht Zielsequenzen (Pribsch *et al.*, akzeptiert; Materna *et al.*, im Druck).

Das Ausmaß der posttranskriptionellen Inhibition war in den hier verwendeten Karzinomzelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Reduktion der MDR1 mRNA-Expression bewegte sich in einem Rahmen von 65 % bis 91 % und hielt zwischen drei und fünf Tage an. Die Sensitivierung lag dabei in einem Bereich von 48 % bis 89 % und ist

vergleichbar mit der chemosensitivierenden Aktivität von *Hammerhead*-Ribozym-kodierenden Vektoren gegen resistenz-assoziierte Faktoren (Holm *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994 und Kowalski *et al.*, 2002). Zum Zeitpunkt des Einreichens stellten die Ergebnisse für die gastrointestinalen Tumorzelllinien die erste Arbeit dar, die erfolgreich darlegen konnte, daß ein resistenz-assoziiierter Faktor durch siRNAs effektiv und spezifisch reprimiert werden kann und dies zu einer Chemosensitivierung der Zellen führt (Nieth *et al.*, 2003). Eine im gleichen Zeitraum von Wu *et al.* publizierte Arbeit konnte durch zwei exogene anti-MDR1 siRNAs in multidrug-resistenten Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien ebenfalls die Sensitivität gegenüber Doxorubicin um 67 % bis 92 % erhöhen (Wu *et al.*, 2003). Die siRNA-abhängigen Effekte ließen sich indessen nur über 48 Stunden aufrechterhalten. Einer der verwendeten siRNA Duplexe war zudem gegen einen ähnlichen Bereich auf der MDR mRNA, wie die siRNA MDR-A, gerichtet. Auf die MDR1 mRNA Referenzsequenz NM_000927 bezogen erkannte deren siRNA einen Bereich von 508 - 528 nt innerhalb der Konsensus-Sequenz im Vergleich zum Bereich 503 – 523 nt der siRNA MDR-A. In der 61-fach doxorubicin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinie verringerte diese siRNA die Anthrazyklinresistenz um 80 % und in der 300-fach resistenten Mammakarzinomzelllinien um 92 %. Ein direkter Vergleich der beiden Konstrukte bezüglich ihrer Effektivität ist aufgrund der sehr unterschiedlichen experimentellen Ansätze und Modellsysteme abschließend nicht möglich.

In keiner bisher veröffentlichten Studie konnte durch anti-MDR1 siRNAs eine komplette Inhibition der MDR1 mRNA-Expression und der Chemoresistenz erreicht werden (Übersicht: Lage, 2006).

4.2 Anwendung von shRNA exprimierenden Vektoren *in vitro*

Die Verwendung von chemisch synthetisierten siRNAs stellt wie oben gezeigt eine sehr gute Methode zur Herstellung und Untersuchung von „knockdown“ Phänotypen dar. Aufgrund der unterschiedlichen zellulären Gegebenheiten ist diese Methode jedoch in ihrer Wirkstärke begrenzt und nur von temporärer Natur. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde Strategien zur effektiven und dauerhaften Expression endogener dsRNAs in humane Zellen entwickelt (Tuschl *et al.*, 2002). Diese Systeme verwenden entweder Plasmide oder virale Vektoren, die eine Expressionskassette tragen, welche shRNAs produzieren. Diese werden in der Zelle anschließend durch den Dicer in die entsprechenden siRNAs prozessiert (Brummelkamp *et al.*, 2002; Siolas *et al.*, 2005). Eine Alternative stellt die separate Expression des *sense*- und *antisense*-Strangs dar, welche in der Zelle zu einer funktionellen siRNA hybridisieren (Miyagishi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Für die Transkription der shRNAs werden zumeist humane RNase P (H1)-RNA-, U6-snRNA-, oder Val-tRNA-Promotor verwendet, die von der RNA-Polymerase III abgelesen werden (Brummelkamp *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2002; Kawasaki *et al.*, 2003). Neuere Arbeiten zeigen, daß die Expression von shRNAs den anderen endogenen Strategien und der Nutzung von siRNAs vorzuziehen ist, da die Inkorporation und Prozessierung durch den Dicer positive Auswirkungen auf die Effizienz der Genrepression haben (Miyagishi *et al.*, 2003; Siolas *et al.*, 2005).

4.2.1 Auswahl des Vektorsystems und der Zielsequenzen

Die oben beschriebenen transienten Ergebnisse zur Überwindung der klassischen Multidrugresistenz mittels anti-MDR1 siRNAs (siehe oben) sollten nun mit der Effizienz eines stabilen anti-MDR1 shRNA-Expressionssystems verglichen werden. Dabei wurde auf die bereits verwendeten Karzinomzelllinien als Modellsysteme und die gut definierten Zielsequenzen zurückgegriffen, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Auf Grundlage der oben beschriebenen MDR1 Zielsequenzen wurde anti-MDR1 shRNA-Expressionssysteme entwickelt, denen ein kompakter und einfach aufgebauter H1-Promotor zu Grunde lag (psiRNAh-H1, InvivoGen). Bei der methodischen Umsetzung ergab sich jedoch das Problem, daß es bei dem shRNA MDR-B Oligonukleotid zu einer frühzeitigen Transkriptionstermination kommen könnte. Das regulär durch den Vektor codierte Terminationssignal besteht aus fünf Thymidinen und führt zu einer Beendigung der Transkription nach dem zweiten Uridin, wodurch eine shRNA mit einem 2 nt Überhang am 3' Ende entsteht. Als Folge zweier zusätzlicher endständiger Thymidine in dem shRNA MDR-B

Oligonukleotid käme es somit theoretisch zur Ausbildung einer um zwei Nukleotide verkürzte shRNA. Aus diesem Grund wurden zwei weitere shRNA Konstrukte, deren Zielsequenz um zwei Nukleotide *downstream* verschoben (shRNA MDR-C und -D) wurde, in die Untersuchung mit einbezogen. Als eine weitere Änderung kam die Vergrößerung der Verbindungschleife in der shRNA MDR-C von 5 nt auf 9 nt hinzu, um den Einfluß der Größe der Verbindungschleife auf die Inhibition zu untersuchen.

4.2.2 Generierung stabiler Transfektanten

Aus den drei chemoresistenten Karzinomzelllinien sind stabile Transfektanten etabliert worden, die entweder den unmodifizierten Expressionsvektor (psiRNAh-H1), die Expressionsvektoren mit integrierter anti-MDR1 shRNA oder den shRNA GFP-exprimierenden Vektor enthielten. Die RNA-Interferenz-abhängige Inhibition in den Transfektanten wurde durch mRNA-Expressionsanalyse mittels Northern Blot detektiert.

In den untersuchten Transfektanten kam es zu einer unterschiedlich starken Degradation der MDR1 mRNA, wobei die Ergebnisse teilweise Zelltyp- und/oder Konstrukt-abhängig waren. In der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB konnte in keiner der anti-MDR1 shRNA-Transfektanten eine Repression der MDR-Biosynthese nachgewiesen werden. Während der Transfektionsreaktion zur Etablierung von stabilen Zellklonen kann nicht kontrolliert werden wie viele Plasmidkopien aufgenommen werden. Auch die Integration des Expressionsvektor erfolgt zufällig, und abhängig von benachbarten genomischen Strukturen kann dadurch die Expressionsstärke sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden. Als weitere mögliche Begründung ist aufzuführen, daß bisher noch wenig über die Prozessierung der shRNAs durch den Dicer bekannt ist, so daß die Anwendung derselben zur Zeit auf der Grundlage empirischer Beobachtungen erfolgt. Es besteht die Möglichkeit, daß die intrazellulär exprimierten shRNAs in dieser Zelllinie schlecht oder in einer ungewünschten Art und Weise vom Dicer prozessiert werden und dadurch nur wenige aktive siRNAs vorliegen. Aufgrund der starken Überexpression von MDR1 in der Pankreaskarzinomzelllinie ist jedoch die siRNA-Konzentration von entscheidender Bedeutung. Bei einer sehr langsamen Umsetzung in siRNAs besteht zusätzlich die Möglichkeit, daß die doppelsträngigen shRNAs von der Zelle erkannt und durch Nukleasen abgebaut werden. Aus den oben genannten Gründen und der Tatsache heraus, daß nur eine geringe Anzahl von Klonen untersucht worden ist, lassen sich abschließend keine Rückschlüsse über die Induktion der RNA-Interferenz durch die Expression von RNAs in dieser Zelllinie treffen.

Ebenfalls keinen Einfluß auf die MDR1 mRNA-Expression hatte die Transfektion des

shRNA MDR-**B**-kodierenden Vektors. Damit konnte die Annahme, daß es bei dieser shRNA zu einem frühzeitigen Transkriptionsabbruch und als Folge daraus zu einer Beeinträchtigung der Effektivität kam, unterstützt werden. Wie wichtig die Länge des 3' Überhangs für die Prozessierung durch den Dicer ist, konnten Vermeulen und Kollegen, die die Schnittprodukte verschiedener shRNAs mit und ohne Überhang getestet haben, zeigen (Vermeulen *et al.*, 2005). Dabei stellte sich heraus, daß die Produkte, die nach der Prozessierung durch den Dicer entstanden sind, in ihrer Länge stark variierten. So entstanden aus shRNAs (70 nt) mit einem 2 nt kurzen Überhang 23–24 nt lange siRNAs, während ein Fehlen des beschriebenen Überhangs zu längeren Produkten führte (25–26 nt). In ihrer umfassenden Arbeit an HEK293 Zellen konnten sie darüber hinaus zeigen, daß nicht nur die Länge des 3' Überhangs Einfluß auf den Schnittort hat, sondern auch die Effektivität und die Formierung von Nebenprodukten. So entstehen aus der Inkorporation von shRNAs mit kurzen Überhängen (0–1 nt) nach der Prozessierung durch den Dicer neben primären (24–36 nt) auch sekundäre (2–5 nt) Schnittprodukte. Bei längeren Überhängen (2–5 nt) kommt es nur zu Ausbildung von siRNAs, die kleiner als 24 nt sind. Diese Arbeit demonstriert die determinierende Rolle, die dem shRNA- und dem siRNA-Überhang für die Prozessierung und Funktionalität zufällt und untermauert die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der shRNA MDR-**B**.

In der Magen- und der Mammakarzinomzelllinien konnten für die Expressionssysteme shRNA MDR-**A**, -**C** und -**D**, Transfektanten mit einer moderaten bis starken MDR1 Genrepression etabliert werden.

4.2.3 Funktionelle Untersuchungen der Effekttransfektanten

4.2.3.1 Reversion des P-Glykoprotein-abhängigen Resistenzphänotyps

Jeweils eine Transfektante der Magen- und Mammakarzinomzelllinie, die eine starke Repression der MDR1 mRNA und damit verbunden eine Verringerung des Proteins aufzeigten, wurde nun auf ihre Resistenzeigenschaften gegen ein Anthrazyklin getestet.

Die Sensitivität gegenüber den Anthrazyklinen Daunorubicin und Doxorubicin konnte in den Effektklonen deutlich um 70 bis 100 % gesteigert werden. Eine komplette und dauerhafte Reversion des stark ausgeprägten MDR-Phänotyps wurde in der shRNA MDR-**A** sowie der shRNA MDR-**C** Transfektante der Magenkarzinomzelllinien EPG85-257RDB erreicht. Auch in der Mammakarzinomzelllinie MATu/ADR konnte durch die Integration des shRNA MDR-**D** kodierenden Vektors die Resistenz auf das Niveau der sensiblen Zelllinie gesenkt werden. Eine permanente Überwindung der P-Glykoprotein-vermittelten

Multidrugresistenz ließ sich somit in unterschiedlichen Zellmodellen durch exogene shRNAs erzielen. Die Kontrolltransfektanten hingegen zeigten marginale Expressions- und Resistenzunterschiede im Vergleich zu den Ausgangszelllinien.

Bei dem Vergleich mit anderen Untersuchungen zur Modulation der Multidrugresistenz mit anti-MDR1 shRNA-exprimierende Vektoren fällt die unterschiedliche Effizienz der eingesetzten Strategien auf (Stege *et al.*, 2004; Celiuș *et al.*, 2004; Pichler *et al.*, 2005). So erreichte in einer publizierten Arbeit die stabile Expression von shRNAs in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3TR nicht die Wirksamkeit von anti-MDR1 siRNAs (Duan *et al.*, 2004). In einer anderen Studie wiederum war der stabile RNA-Interferenz Effekt der transienten Strategie überlegen, wobei eine komplette Reversion aber nicht erreicht werden konnte. (Xu *et al.*, 2004). In diesen beiden Studien wurde die shRNA-Expression durch einen U6-RNA Promotor kontrolliert. Im Vergleich dazu führte die Transkription der endogenen siRNAs über einen H1-RNA Promotor jeweils zur Überwindung der P-Glykoprotein-abhängigen Multidrugresistenz sowohl in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB als auch der Leukämiezelllinie KD30 (Stege *et al.*, 2004; Yagüe *et al.*, 2004).

Adenovirale Systeme zeichnen sich im Vergleich zu Plasmidvektoren durch einen sehr effizienten Gentransfer und gute Infizierbarkeit von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen aus, so daß die Transkription von anti-MDR1 shRNAs über solche Systeme vor allem *in vivo* vorteilhaft ist. Diese Strategie aufgreifend wurden adenovirale Vektoren zur Expression der hier verwendeten shRNA MDR-C und shRNA MDR-D in den gastrointestinalen Karzinomzelllinien (EPP85-81RDB und EPG85-257RDB) konzipiert. Hierbei konnte ebenfalls eine vollständige Inhibition der biologischen Aktivität der MDR1 Effluxpumpe erreicht werden, was sich in einer der sensiblen Zelllinien entsprechenden Akkumulation von Daunorubicin niederschlug (Kaszubiak *et al.*, eingereicht).

Der Einfluß der Verbindungsschleife auf die Prozessierung und die Aktivität der shRNAs wird aufgrund der unterschiedlichen Daten noch kontrovers diskutiert. Die erstmalige endogene Expression von shRNAs zeigte bei dem Vergleich von 5 nt, 7 nt und 9 nt kurzen Verbindungsschleifen starke Unterschiede in der Gensuppressionsaktivität. Danach wäre eine 9 nt Verbindungsschleife der wenig effektiven 5 nt Version vorzuziehen (Brummelkamp *et al.*, 2002). Eine alternative Studie zeigte aber auch gut Inhibitionseffekte mit 3 nt und 5 nt kurzen Verbindungsschleifen (Jacque *et al.*, 2002). Bei den in unserer Arbeitsgruppe eingesetzten anti-BCRP shRNAs zeigten Verbindungsschleifen der Größe 5 nt bis 11 nt in der mitoxantron-resistenten Magenkarzinomzelllinie (EPG85-257RNOV) keine nennenswerte

Beeinflussung der posttranskriptionellen Inhibitionsstärke (Pribsch *et al.*, akzeptiert). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen ebenfalls keine Beeinflussung erkennen.

4.3 Anwendung von shRNA exprimierenden Vektoren *in vivo*

Die oben genannten Ergebnisse verdeutlichen, daß die durch MDR1 hervorgerufene Multidrugresistenz *in vitro* via RNA-Interferenz nicht nur moduliert, sondern auch überwunden werden kann. Die klinische Relevanz des ABC-Transporters läßt nun aber die Frage aufkommen, inwieweit siRNA-basierende Methoden in einem gentherapeutischen Ansatz zur Unterstützung einer Chemotherapie entwicklungsfähig sind. Ein notwendiger Schritt zur Klärung dieser Frage war es deshalb, die Effektivität der hier verwendeten shRNA-kodierenden Vektoren im Versuchstier zu untersuchen. Als Tumormodell wurde die Mammakarzinomzelllinie MaTu/ADR, die sich aufgrund der klinischen Relevanz von Brustkrebs und der u. a. standardmäßigen Behandlung mit Doxorubicin als besonders geeignet herausstellte, verwendet.

Die Applikation des sehr wirksamen shRNA MDR-C-kodierenden Plasmids erfolgte mittels Jet-Injektion, einer effizienten Methode zum intratumoralen Transfer kleiner Mengen nackter DNA (Walther *et al.*, 2002). Diese Methode zeichnet sich durch die hohe Geschwindigkeit, mit der die Einzelapplikationen erfolgen, aus, wodurch eine gute Penetrierung der Haut und des darunterliegenden Gewebes erreicht wird. Alle notwendigen Parameter für die *in vivo* Injektion sind in vorangegangenen Untersuchungen bereits ausgetestet worden (Walther *et al.*, 2006).

In den Mäusen konnte durch intratumorale Applikation des anti-MDR1 shRNA kodierenden Vektors eine komplette Wiederherstellung der Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin in dem resistenten Tumormodell erreicht werden. Die Effizienz der kombinierten Gen- und Chemotherapie wird durch die Verminderung des *in vivo* Tumorwachstums auf das Volumen des von der sensiblen Zelllinien-abgeleiteten Tumors reflektiert. Die Injektion des Ausgangsvektors (psiRNA-hH1) hatte keine das Tumorwachstum hemmende Wirkung. Die Analyse von Tumorschnitten nach der Injektion des anti-MDR1 shRNA Vektors zeigte die Erniedrigung der mRNA und Proteinmenge über einen Zeitraum von drei Tagen mit einem Maximum von 92 % (mRNA Expression) am zweiten Tag.

Die RNA-Interferenz-abhängigen Genrepression von murinem bzw. humanem MDR1 wurde bisher in zwei Studien *in vivo* untersucht. Zum einen erzielten Pichler und Kollegen durch retrovirale anti-MDR1 shRNA Vektoren eine verminderte Aktivität der Effluxpumpe (Pichler

et al., 2005). Der Nachweis im Tumorimplantat erfolgte dabei am lebenden Tier über die direkte Verfolgung (*bioluminescence imaging*) des *Renilla* Luciferasefluorophors, Coelenterazin, welches ein Transportsubstrat von P-Glykoprotein ist. In einem weiteren Versuch wurde das MDR1-*Firefly* Luciferase (MDR1-FLuc) Fusionskonstrukt über somatischen Gentransfer mittels hydrodynamischer Infusion in die Leber der Maus eingebracht. Im Vergleich zu Kontrollmäusen kam es durch die MDR1-spezifische shRNA zu einer 4-fach erniedrigten Biolumineszenz des Reporterproteins. Es wurde damit der Nachweis erbracht, daß die *in vivo* Applikation der shRNA kodierenden Vektoren sowohl im Tumorimplantat als auch in der Leber zu einer Inhibition der MDR1 mRNA-Expression und dessen Funktion führen. Die zweite Arbeit beschäftigte sich mit der Inhibition der murinen *mdr1a* und *mdr1b* Gentranskripten (Matsui *et al.*, 2005). Durch die *large-volumen* und *high-speed* Injektion von siRNAs bzw. siRNA-exprimierenden Vektoren gegen *mdr1a*, konnte das mRNA Niveau in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant um 50 - 60% gesenkt werden. Die Reduktion des Proteingehalts war aber vergleichsweise gering. Ähnliche Effekte wurden bei Experimenten mit siRNA-exprimierenden Vektoren gegen *mdr1a/mdr1b* beobachtet.

Abschließend ist zu sagen, daß die *in vivo* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht nur die erstmalige Applikation eines nackten shRNA-exprimierenden Vektors in Krebszellen mittels Jet-Injektion darstellen, sondern auch die effektive Suppression der MDR1 mRNA und der Überwindung der zugrunde liegenden Multidrugresistenz *in vivo* darlegen.

4.4 Schlußbetrachtung

Seit mehr als zwei Jahrzehnten werden Methoden zur Hemmung von P-Glykoprotein in multidrug-resistenten Tumorzellen, mit dem Ziel der Effektivitätssteigerung der Chemotherapie, intensiv untersucht (Ling et al., 1997). Diverse Strategien, dazu gehören pharmakologisch aktive Substanzen und Antikörper, wurden bisher verfolgt ohne den Weg vom Labor in die Klinik gefunden zu haben.

Durch den Einsatz exogener und endogener siRNAs konnte in der vorliegenden Arbeit über die Induktion der RNA-Interferenz die Expression von MDR1 gehemmt werden und eine Resensitivierung der Zellen *in vitro* und *in vivo* erreicht werden.

Die Ergebnisse aus der Applikation des anti-MDR1 shRNA-kodierenden Vektors *in vivo* lassen weiterhin das Potential dieser Strategie für die gentherapeutische Behandlung chemoresistenten Malignomen in Kombination mit antineoplastischen Substanzen erkennen. Bevor jedoch ein klinischer Einsatz zur Behandlung der MDR oder von Erkrankungen denkbar ist, gilt es noch mehrere Hindernisse zu überwinden. Zu allererst muß das Verständnis für den zugrunde liegenden Mechanismus noch vertieft werden, um die biologischen Grundlagen der Prozessierung durch den Dicer sowie der mRNA/siRNA-Erkennung zu verstehen und dadurch „off-target“ Effekte zu vermeiden. Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung eines siRNA-basierenden Therapeutikums ist die Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von siRNA-Molekülen. Die Verwendung von bestimmten Sequenzmotiven und die chemische Modifikation am Oligonukleotid-Rückgrat stellen dabei einen guten Ansatzpunkt dar, um die nötige Stabilisierung zu erreichen. Die zelluläre Aufnahme ist ebenfalls eine kritische Determinante, weshalb verstärkt an der Entwicklung von Trägermaterialien für die Verwendung *in vivo* geforscht wird. Das Spektrum reicht dabei von Polyethylenaminen über polymere Nanopartikel bis hin zu Liposomen. Neben der Gabe von synthetischen siRNAs und dem viralen Gentransfer besteht desweiteren die Möglichkeit der konstitutiven Induktion der RNA-Interferenz durch Plasmide oder viralen Expressionskassetten im Modellorganismus. Die erfolgreiche Anwendung von solchen Konstrukten in soliden Tumoren konnte bereits für HIV-Zielgene sowie die VEGF- und p53-RNA im Tierversuch gezeigt werden (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Read *et al.*, 2003). Auf eine Therapie der P-Glykoprotein-abhängigen MDR bezogen ist die systemische Anwendung von Plasmidvektoren jedoch *per se* nicht möglich, da das Protein ubiquitär exprimiert wird und maßgeblich an der Detoxifikation von Xenobiotika

und Neurotoxinen beteiligt ist. Alternative Strategien stellen die Weiterentwicklung von Vektoren mit Spezifität zu multidrug-resistenten Zellen und / oder eines kürzlich beschriebenen „replikationsdefizienten“ E1A-mutierten adenoviralen Vektors, der effizient und selektiv sich in P-Glykoprotein-überexprimierenden Karzinomzellen replizieren kann, dar (Labialle *et al.*, 2005; Holm *et al.*, 2004).

Einige der oben genannten Punkte wurden aufgegriffen und sind in unserer Arbeitsgruppe zur Zeit Gegenstand von umfangreichen Untersuchungen. Zum einen wurden mehrere siRNA MDR-**B** Derivate mit 2'O-Methyl-Modifikationen am *sense*- bzw. *antisense*-Strang konzipiert. In den gastrointestinalen Tumorzelllinien wird gegenwärtig die Effektivität dieser Konstrukte mit der unmodifizierten siRNA verglichen werden. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist die Inkapsulierung der verwendeten siRNAs in Polylactid-Co-Glycolid (PLGA)-Nanopartikeln. In Zellkulturuntersuchungen soll geklärt werden, inwieweit die zelluläre Aufnahme dadurch verbessert werden kann und ob es zu einer Steigerung der siRNA-abhängigen Inhibition der MDR1-Expression kommt.

In der grundlagenorientierten und biomedizinischen Forschung ist die RNA-Interferenz Technologie zur funktionellen Genomanalyse und zur Generierung von „knockdown“ Tiermodellen bereits etabliert. Klinische Studien, so z.B. der Firma Alnylam zur siRNA-basierenden Behandlung der altersbedingten „feuchten“ Makulardegeneration, werden zeigen, inwieweit das gentechnische Verfahren der RNA-Interferenz in der Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden kann.

5 Literaturverzeichnis

Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A. *et al.* (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361-398.

Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E. & Gottesman M.M. (2003): P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468-7485.

Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G. *et al.* (1969): Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 11 (6), 1101-1110.

Arnal, M., Franco, N., Fargeot, P. *et al.* (2000): Enhancement of *mdr1* gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 61 (1), 13-20.

Aubel-Sadron, G. & Londos-Gagliardi, D. (1984): Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 66 (5), 333-352.

Baldini, N., Scotlandi, K., Barbanti-Brodano, G. *et al.* (1995): Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N. Engl. J. Med.* 333 (21), 1380-1385.

Bartel, D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2), 281-297.

Bass, B.L. (2001): RNA interference. The short answer. *Nature* 411 (6836), 428-429.

Benderra, Z., Trussardi, A., Morjani, H. *et al.* (2000): Regulation of cellular glutathione modulates nuclear accumulation of daunorubicin in human MCF7 cells overexpressing multidrug resistance associated protein. *Eur. J. Cancer* 36 (3), 428-434.

Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. (1999): The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* 1461(2), 347-357.

Borst, P. & Elferink, R.O. (2002): Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537-592.

Booser, D.J. & Hortobagyi, G.N. (1994): Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 47 (2), 223-258.

- Brangi, M., Litman, T., Ciotti, M. & Nishiyama, K.** (1999): Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res.* 59 (23), 5938-5946.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducreaux, A. *et al.*** (2003): Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet.* 34 (3), 263-264.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R.** (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553,
- Celius, T., Garberg, P. & Lundgren, B.** (2004): Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324, 365-371.
- Cerutti, L., Mian, N. & Bateman, A.** (2000): Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25 (10), 481-482.
- Chan, H. S., Thorner, P. S., Haddad, G. & Ling, V.** (1990): Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.* 8 (4), 689-704.
- Chan, H. S., Haddad, G., Thorner, P.D. *et al.*** (1991): P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 325 (23), 1608-14.
- Chaudhary, P.M. & Roninson, I.B.** (1993): Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (8), 632-639
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K. *et al.*** (1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381-389.
- Cogoni, C. & Macino, G.** (1999): Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 657-662.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H. *et al.*** (1992): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258 (5088), 1650-1654.
- Conrad, C. & Rauhut, R.** (2002): Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2), 116-129.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P. & Posner, J.B. (1989): Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *86* (2), 695-698.

Dean, M., Hamon, Y., Chinini, G. et al. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* *42* (7), 1007-1017.

Den Boer, M.L., Pieters, R., Kazemier, K.M. et al. (1999): Relationship between the intracellular daunorubicin concentration, expression of major vault protein/lung resistance protein and resistance to anthracyclines in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *13*(12), 2023-2030.

Dietel, M., Arps, H., Lage, H. & Niendorf, A. (1990): Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* *50* (18), 6100-6106.

Dold, U., Hermanek, P., Hoffken, K. & Sack, H. (1993): Allgemeine Prinzipien der Tumorthherapie. *Praktische Tumorthherapie*. S.49-108, Hrsg.: Dold, U., Hermanek, P., Hoffken, K. & Sack, H. Thieme-Verlag.

Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V. et al. (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95* (26), 15665-15670.

Duan, Z., Brakora, K.A. & Seiden, M.V. (2004): Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *3* (7), 833-838.

Dubost, M., Ganter, P., Maral, R. et al. (1963): A new antibiotic with cytostatic properties: rubidomycin. *C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* *257* : 1813-1815. French.

Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. (2003): Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 457-467.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. (2002): Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* *26* (2), 199-213.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W. et al. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Natur* *411*, 494-498.

Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J. et al. (1996): Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2 (4), 659-668.

Fire, A., Xu, S., Kostas, S.A. et al. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fricker, S.P. & Buckley, R.G. (1996): Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* 16 (6B), 3755-3760.

Gadsby, D.C., Vergani, P. & Csanady, L. (2006): The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440 (7083), 477-483.

Gottesman, M.M. & Pastan, I. (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.

Gottesman, M.M., Pastan, I. & Ambudkar, S.V. (1996): P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6 (5), 610-617.

Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2 (1), 48-58.

Gottesman, M.M. (2002): Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53, 615-627.

Grünweller, A., Wyszko, E., Bieber, B. et al. (2003): Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.* 31 (12), 3185-3193.

Hannon, G.J. (2002): RNA interference. *Nature* 418 (6894), 244-251.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K. et al. (2001): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114 (Pt 24), 4557-4565.

Higgins, C.F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.

Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J. et al. (1997): Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin. Cancer Biol.* 8 (3), 135-142.

Hipfner, D.R., Deeley, R.G. & Cole, S.P. (1999): Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim. Biophys. Acta* 1461(2), 359-376.

Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O. *et al.* (2000): Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene. Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. USA* 97, 3473-3478.

Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T. *et al.* (2002): Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30 (8), 1757-1766.

Holm, P.S., Scanlon, K.J. & Dietel, M. (1994): Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br. J. Cancer.* 70 (2), 239-243.

Holm, P.S., Dietel, M. & Krupp, G. (1995): Similar cleavage efficiencies of an oligoribonucleotide substrate and an *mdr1* mRNA segment by a hammerhead ribozyme. *Gene* 167 (1-2), 221-225.

Holm, P.S., Lage, H., Bergmann, S. *et al.* (2004): Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64 (1), 322-328.

Jacque, J.-M., Triques, K. & Stevenson, M. (2002): Modulation of HIV1-replication by RNA interference. *Nature* 418, 435-438.

Jagus, R., Joshi, B. & Barber, G.N. (1999): PKR, apoptosis and cancer. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 31 (1), 123-138.

Jin, S. & Scotto, K.W. (1998): Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol. Cell Biol.* 18 (7), 4377-4384.

Johnson, D.R., Finch, R.A., Lin, Z.P. *et al.* (2001): The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance *mdr1a/1b*- and *mrp1*-deficient mice. *Cancer Res.* 61 (4), 1469-1476.

Juliano, R.L. & Ling, V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* 455, 152-162.

Kartner, N., Riordan, J.R. & Ling, V. (1983): Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221(4617), 1285-1288.

Kaszubiak, A., Holm, P.S. & Lage, H. (eingereicht): Reversal of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes.

Kawasaki, H. & Taira, K. (2004): Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Letters to Nature* *431*, 211-216.

Kawasaki, H. & Taira, K. (2003): Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic. Acids Res.* *31*, 700-707.

Kioka, N., Yamano, Y., Komano, T. et al. (1992): Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* *301* (1), 37-40.

Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Grogan, T.M. & Dalton, W.S. (1994): P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* *83* (9), 2451-2458.

Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J.F. & Ohnuma, T. (1994): Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res.* *54* (5), 1271-1275.

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L. & Lage, H. (2002): Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* *9* (7), 579-586.

Kowalski, P., Surowiak, P. & Lage, H. (2005): Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol Ther.* *11* (4), 508-522.

Krishna, R. & Mayer, L.D. (2000): Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European J. of Pharmaceutical Sciences* *11*, 265-283.

Labialle, S., Gayet, L., Marthinet, E. et al. (2002): Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem. Pharmacol.* *64* (5-6), 943-948.

Labialle, S., Dayan, G., Michaud, M. et al. (2005): Gene therapy of the typical multidrug resistance phenotyp of cancer: a new hope? *Semin. Oncol.* *32* (6), 583-590.

- Lage, H., Jordan, A., Scholz, R. & Dietel, M.** (2000): Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Hyperthermia* *16* (4), 291-303.
- Lage, H. & Dietel, M.** (2002): Multiple mechanisms confer different drug-resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *128* (7), 349-357.
- Lage, H.** (2006): MDR1/P-glycoprotein (ABCB1) as target for RNA Interference-mediated reversal of multidrug resistance. *Current Drug Targets* *7* (7), 813-21.
- Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G. et al.** (2002): Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.* *20* (5), 500-505.
- Leith, C.P., Kopecky, K.J., Chen, I.M. et al.** (1999): Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* *94* (3), 1086-99.
- Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G. et al.** (2002): Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet.* *32* (1), 107-108.
- Lippmann, Z. & Martienssen, R.** (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* *431*, 364-370.
- Ling, Y.H., Priebe, W., Yang, L.Y. et al.** (1993): In vitro cytotoxicity, cellular pharmacology, and DNA lesions induced by annamycin, an anthracycline derivative with high affinity for lipid membranes. *Cancer Res.* *53* (7), 1583-1589.
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E. et al.** (2000): The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.* *113*, 2011-2021.
- Liu, C., Qureshi, I.A., Ding, X. et al.** (1996): Modulation of multidrug resistance gene (mdr-1) with antisense oligodeoxynucleotides. *Clin. Sci. (Lond).* *91* (1), 93-98.
- Loe, D.W., Almquist, K.C., Deeley, R.G. & Cole, S.P.** (1996): Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* *271* (16), 9675-9682.
- Lum, B.L. & Gosland, M.P.** (1995): MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *9* (2), 319-336.

Materna, V., Stege, A., Surowiak, P., et al. (in Druck; 2006): RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications

Matsui, Y., Kobayashi, N., Nishikawa, M. & Takakura, Y. (2005): Sequenz-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference. *Pharm. Res.* 22 (12), 2091-2098.

Matzke, M.A. & Birchler, J.A. (2005): RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6 (1), 24-35.

McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T. et al. (2002): RNA interference in adult mice. *Nature* 418 (6893), 38-39.

Miyagishi, M. & Taira, K. (2002): Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res. Suppl.* (2), 113-114.

Miyagishi, M., Hayashi, M. & Taira, K. (2003): Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13 (1), 1-7.

Miyake, K., Mickley, L., Litman, T. et al. (1999): Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59 (1), 8-13.

Montgomery, M.K., Xu, S. & Fire, A. (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15502-15507.

Muratovska, A. & Eccles, M.R. (2004): Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* 558 (1-3), 63-68.

Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 2 (4), 279-289.

Nieth, C. & Lage, H. (2005): Induction of the ABC-transporters MDR1/P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1), and BCRP (ABCG2) during establishment of multidrug resistance following exposure to mitoxantrone. *J. Chemother.* 17 (2), 215-223.

Nieth, C., Pribsch, A., Stege, A. & Lage, H. (2003): Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotyp by RNA interference (RNAi). *FEBS Letters* 545, 144-150.

Pastan, I. & Gottesman, M.M. (1987): Multiple-drug resistance in human cancer. *N. Engl. J. Med.* 316 (22), 1388-1393.

Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I. & Engelke, D.R. (2002): Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* 20 (5), 505-508.

Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M. & Hamilton, T.C. (1993): A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer* 94 (3), 395-399.

Pfreundschuh, M. Prinzipien der medikamentösen Tumorphathologie. Kompendium Internistische Onkologie. S.357-412, Hrsg.: Schmoll, H. J., Höffken, K. & Possinger, K. (1996] 2. Auflage Springer-Verlag.

Pichler, A., Zelcer, N., Prior, J.L. et al. (2005): *In vivo* RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Cancer Therapy: Preclinical.* 11, 4487-4494.

Pirker, R., Wallner, J., Geissler, K. et al. (1991): MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia.. *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (10), 708-712.

Pratt, W.B., Ruddon, R.W., Ensminger, W.D. & Magbaum J. (1994): The anticancer drugs. Oxford Univ Press.

Pribsch, A., Rompe, F., Kowalski, P., et al. (akzeptiert; 2006): Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance (MDR) by RNA interference in human gastric carcinoma cells. *Oligonucleotides*

Read, M.L., Stevenson, M., Farrow, P.J. et al. (2003): RNA-based therapeutic strategies for cancer. *Exp. Opin. Ther. Patents* 13, 627-638.

Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q. et al. (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22 (3), 326-330.

Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N. et al. (1985): Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316 (6031), 817-819.

Rittierodt, M., Tschernig, T. & Harada, K. (2004): Modulation of multidrug-resistance-associated P-glycoprotein in human U-87 MG and HUV-ECC cells with antisense oligodeoxynucleotides to MDR1 mRNA. *Pathobiology* 71 (3), 123-128.

Robert Koch Institut (2006):

http://www.rki.de/cln_011/nn_226978/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschuere/kid2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2006

Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E.L. et al. (2000): The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 (1), 42-46

Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski A.V. et al. (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* 33 (3), 401-406.

Rye, P.D. & Stigbrand, T. (2004): Interfering with cancer: A brief outline of advances in RNA interference in oncology. *TumorBiology* 25, 329-336.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12), 5463-5467.

Saurin, W., Hofnung, M. & Dassa, E. (1999): Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* 48 (1), 22-41.

Scherr, M., Morgan, M.A. & Eder, M. (2003): Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr. Med. Chem.* 10 (3), 245-256.

Schinkel, A.H. (1997): The physiology function of drug-transporting P-glycoproteins. *Sem. Cancer Biol.* 8, 161-170.

Schneider, E. & Hunke, S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22 (1), 1-20.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P.D. (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115 (2), 199-208.

Shen, D.W., Fojo, A., Roninson, I.B. et al. (1986): Multidrug resistance of DNA-mediated transformants is linked to transfer of the human *mdr1* gene. *Mol. Cell Biol.* 6 (11), 4039-45

Shen, D.W., Pastan, I. & Gottesmann, M.M. (1998): Cross-resistance to methotrexate and metals in human cisplatin-resistant cell lines results from a pleiotropic defect in accumulation of these compounds associated with reduced plasma membrane binding proteins. *Cancer Res.* 58, 258-275.

Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J. *et al.* (2005): Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotechnol.* 23 (2), 227-231.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. *et al.* (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (13), 1107-1112.

Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J. *et al.* (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 5, 834-839.

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R. *et al.* (1998): How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.

Stege, A., Pribsch, A., Nieth, C. & Lage, H. (2004): Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther.* 11 (11), 699-706.

Stein, U., Walther, W., Lemm, M. *et al.* (1997): Development and characterisation of novel human multirug resistant mammary carcinoma lines in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer.* 72, 885-891.

Stein, U., Jürchott, K., Schläfke, M. *et al.* (2002): Expression of multidrug resistance genes MVP, MDR1, and MRP1 determined sequentially before, during, and after hyperthermic isolated limb perfusion of soft tissue sarcoma and melanoma patients. *J. Clin. Oncol.* 20, 3282-3292.

Stein, U., Stege, A., Surowiak, P., Walther, W. & Lage, H. (eingereicht): Complete in vivo reversal of the multidrug resistance (MDR) phenotype in a breast cancer model by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA. *Molecular Cancer Therapeutics*

Stuart, D.D., Kao, G.Y. & Allen, T.M. (2000): A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther.* 7 (3), 466-475.

- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H. *et al.*** (1987): Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 7735-7738.
- Tritton TR.** (1991): Cell surface actions of adriamycin. *Pharmacol. Ther.* *49* (3), 293-309.
- Trock, B.J., Leonessa, F. & Clarke, R.** (1997): Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J. Natl. Cancer Inst.* *89* (13), 917-931.
- Tuschl, T.** (2002): Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.* *20* (5), 446-448.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M. & Pastan, I.** (1987): Expressing of a full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 3004-3008.
- Vasanthakumar, G., & Ahmed, N.K.** (1989): Modulation of drug resistance in a daunorubicin resistant subline with oligonucleoside methylphosphonates. *Cancer Commun.* *1* (4), 225-232.
- Vermeulen, A., Behlen, L. & Reynolds, A.** (2005): The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA* *11* (5), 674-682.
- Vickers, T.A., Koo, S., Bennett, C.F. *et al.*** (2003): Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem.* *278* (9), 7108-7118.
- Voigt, W.** (2005): Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med.* *110*, 39-48.
- Wagener, C.** (1996): *Molekulare Onkologie*. Hrsg.: Wagener, C. Thieme-Verlag.
- Walther, W., Stein, U., Fichtner, I. *et al.*** (2002): Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer. *Mol. Biotechnol.* *21* (2), 105-115.
- Warneck, V. & Vornlocher, H.-P.** (2003): siRNA als Plattform für die Entwicklung innovativer Therapeutika in der Onkologie. *Onkologie* *9*, 1121-1129.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. & Wang, M.B.** (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95* (23), 13959-13964.

- Widmaier, R., Wildner, G.P., Papsdorf, G. & Graffi, I.** (1974): Über eine neue, *in vitro* unbegrenzt wachsende Zelllinie MaTu von Mamma-Tumorzellen des Menschen. Arch. Geschwulstforsch. *44* (1), 1-10.
- Wu, H., Hait, W. N. & Yang, J. M.** (2003): Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. Cancer Res. *63* (7), 1515-1519.
- Xu, D., Kang, H., Fisher, M & Juliano, R.L.** (2004): Strategies for inhibition of MDR1 gene expression. Mol. Pharmacol. *66* (2), 268-275.
- Yagüe, E., Higgins, C. F. & Raguz, S.** (2004): Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. Gene Therapy *11* (14), 1170-1174.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P.** (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell *101*, 25-33.
- Zhou, D. C., Marie, J. P., Suberville, A.M. & Zittoun, R.** (1992): Relevance of *mdr1* gene expression in acute myeloid leukemia and comparison of different diagnostic methods. Leukemia *6* (9), 879-885.

Danksagung

Es liegt mir nun sehr nahe, denjenigen Menschen zu danken, die es mir erst ermöglicht haben, diese Doktorarbeit anzufertigen und maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

Mein Dank gilt

- **PD Dr. Hermann Lage** für die überaus interessante Themenstellung und die stete Förderung seinerseits.
- **PD Dr. Wolfgang Dreier** für die Bereitschaft, eine fachfremde Promotion am Institut für Biologie zu betreuen.
- **Prof. Dr. Manfred Dietel** für die Möglichkeit, die Forschungsarbeiten am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charité durchzuführen.
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lage, die mich in angenehmer Arbeitsatmosphäre und mit moralischer Unterstützung durch den Laboralltag begleitet haben. Namentlich **Alexander Kaszubiak, Dr. Petra Kowalski, Liset Lüderitz, Dr. Verena Materna, Franziska Rompe, Birgit Schaefer**. Besonders bedanken möchte ich mich bei **Christiane Nieth** und **Axel Priebisch** für die sehr gute Zusammenarbeit während der anti-MDR siRNA Experimente sowie **Dr. Pawel Surowiak** für die Durchführung der immunzytochemischen Untersuchungen.
- **PD Dr. Ulrike Stein, PD Dr. Wolfgang Walther** und **Dr. Iduna Fichtner** vom Max-Delbrück-Zentrum in Berlin-Buch bzw. der Firma EPO für die Durchführung der *in vivo* Experimente.
- **Dr. Berit Müller, Nicole Sahn, Dr. Wolfgang Schmitt** und **Randolf Schücke** für ihre Freundschaft.

Mein persönlicher Dank gilt meinem Mann **Christoph Bender**, der mich durch seine Geduld und den steten Glauben an mich und meine Fähigkeiten durch so einige Tiefpunkte hindurch gelotst hat.

Meine **Eltern** danke ich für das Vertrauen und die Unterstützung, die sie mir während dieser stürmischen Zeit entgegengebracht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexandra Eva Stege
Geburtsdatum / -ort: 29.07.1975 / Fulda
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: seit 06.12.2005 verheiratet

Schulbildung:

1982 - 1988 Adalbert-Stifter-Schule; Wiesbaden
1988 - 1995 Gymnasium am Mosbacher Berg; Wiesbaden

Studium und Beruf:

10/1995 – 09/1996 Studium der Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin
10/1996 – 10/2000 Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin;
Abschluß Diplom (Note 1,9)
Spezialisierung: Genetik, Biochemie und Mikrobiologie
01/2000 - 09/2000 Diplomarbeit: „*Analyse differentieller mRNA-Expressionsprofile von chemo- und thermoresistenten Magenkarzinomzelllinien.*“
01/2001 – 04/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin
09/2002 – 07/2006 Anfertigung der vorliegenden Dissertation (gefördert durch die DFG und dem RiNA RNA-Netzwerk)
05/2005 – 04/2006 Promotionsabschlußstipendium der Charité-Universitätsmedizin Berlin
09/2006 – 04/2006 Fernstudium an der TFH Berlin „Patentrecht für Ingenieure und Naturwissenschaftler“

Publikationen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Nieth¹, C., Pribsch¹, A., **Stege**¹, A. & Lage, H. (2003): Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). FEBS Letters 545, 144-150.

[¹ geteilte Erstautorenschaft]

Wichert, A., **Stege**, A., Midorikawa, Y., Holm, P.S. & Lage, H. (2004): Glypican-3 is involved in cellular protection against mitoxantrone in gastric carcinoma cells. Oncogene 23 (4), 945-55

Stege, A., Pribsch, A., Nieth, C. & Lage, H. (2004): Stable and complete overcoming of MDR1/P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. Cancer Gene Therapy 11, 699-706.

Pribsch, A., Rompe, F., Kowalski, P., Surowiak, P., **Stege**, A., Materna, V. & Lage, H. (akzeptiert; 2006): Complete reversal of ABCG2-dependent atypical multidrug resistance (MDR) by RNA interference in human gastric carcinoma cells. Oligonucleotides

Materna, V., **Stege**, A., Surowiak, P., Pribsch, A. & Lage, H. (in Druck; 2006): RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications

Stein, U., **Stege**, A., Walther, W. & Lage, H. (eingereicht): Delivery of naked short hairpin RNA-encoding plasmid DNA by jet injection reverses the classical multidrug resistance (MDR) phenotype in a breast cancer model. Molecular Cancer Therapeutics

Kongreßbeiträge

Stege, A., Nieth, C., Pribsch, A. and Lage, H. (2003): Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR) by RNA interference (RNAi). 12th International AEK cancer congress, Würzburg, Book of Abstracts, 183.

Nieth, C., Pribsch, A., **Stege, A.** & Lage, H. (2003): Inhibition of classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, München, Book of Abstracts, LM 2.25.

Nieth, C, Pribsch, A., **Stege, A.** & Lage, H. (2003): Reversal of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). Proc. Am. Ass. Cancer Res. 44, 3744

Pribsch, A., **Stege, A.**, Nieth, C. & Lage, H. (2003): Modulation of P-glycoprotein-/ABC1-mediated multidrug resistance (MDR) by RNA interference (RNAi). 4th FEBS Advanced Lecture Course „ATP-binding cassette (ABC) proteins: from genetic disease to multidrug resistance“, Gosau, Österreich, Abstract Book, 50.

Serra, V., Jürchott, K., Solf, A., Gieseler, C., **Stege, A.**, Dietel, M. & Schäfer, R. (2003): I3K Signalling Pathway Inhibition Sensitises Human Resistant Colon Cancer Cells to the Topoisomerase Inhibitor Daunoblastin. Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduktion-from Membrane to Gene Expression, from Structure to Disease, Brüssel.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; Grant LA 1039/2-3), dem RiNA RNA-Netzwerk (Projekt gefördert durch das BmBF, das Land Berlin und dem Europäischen Entwicklungsfond), sowie der Nachwuchskommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin gefördert.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Berlin, 31. Juli 2006

Alexandra Stege